

Papel de los receptores muscarínicos en la modulación de la transmisión GABAérgica en hipocampo.



Memoria presentada para optar al grado de doctor por:

José Carlos González San Frutos

Dirigida por:

Jesús Miguel Hernández Guijo

Madrid, 2013.

Nada en el Mundo sustituye a la Constancia.
El talento no la Sustituye, pues nada es
Tan Corriente como los Inteligentes Frustrados.
El Genio Tampoco, ya que resulta ser
Tópico el caso de los Genios Ignorados.
Ni siquiera la Educación Sustituye a la
Constancia, pues el Mundo está lleno de Fracasados
Bien Educados.
Solamente la Constancia y la Decisión lo
Consiguen Todo.

Baltasar Gracián

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2-35
1. <u>LA SINAPSIS COLINÉRGICA</u>.....	2-21
1.1. Principales vías colinérgica	2
1.2. Biosíntesis y degradación de la acetilcolina	3
1.3. Receptores para acetilcolina.....	6-14
1.3.1. Receptores nicotínicos.....	6
1.3.2. Receptores muscarínicos.....	10
1.4. Proteínas G.....	14-21
1.4.1. Proteínas G heterotriméricas.....	15
1.4.2. Subtipos de subunidades de las proteínas G heterotriméricas.....	17
1.4.3. Fosfolipasa C.....	17
1.4.4. Adenilato ciclasa.....	20
2. <u>EL HIPOCAMPO</u>.....	22-30
2.1. Descripción anatómica del hipocampo en mamíferos.....	23
2.2. Estructura y organización del hipocampo y el giro dentado	26-27
2.2.1. Giro dentado.....	26
2.2.2. Hipocampo.....	27
2.3. Tipos celulares en la formación hipocampal.....	28
3. <u>IMPLICACIÓN DE LA TRANSMISIÓN COLINÉRGICA <u>EN LA FUNCIONALIDAD DEL HIPOCAMPO</u></u>.....	31-35
3.1. Acetilcolina y plasticidad neuronal.....	31
3.2. Función de la ACh en la generación de ritmos.....	34
II. OBJETIVOS.....	36-37
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38-53
1. <u>AISLAMIENTO Y CULTIVO DE NEURONAS <u>EMBRIONARIAS DE HIPOCAMPO DE RATA</u></u>.....	38
2. <u>TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS</u>.....	41-46
2.1. El <i>patch clamp</i>	41
2.2. Registros electrofisiológicos utilizados en esta tesis.....	44

3. <u>DISOLUCIONES</u>	46-48
3.1. Disoluciones extracelulares empleadas en los diseños experimentales.....	46
3.2. Disoluciones intracelulares empleadas en la elaboración de los experimentos.....	47
4. <u>METODOLOGÍA</u>	48-52
5. <u>COMPUESTOS QUÍMICOS</u>	52-53
6. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y CÁLCULOS MATEMÁTICOS</u>	53
IV. RESULTADOS	54-101
1. Efecto de la activación colinérgica sobre las corrientes postsinápticas y el disparo de potenciales de acción en neuronas hipocampales en cultivo.....	54
2. Características de las IPSCs generadas al activar los nAChRs y/o mAChRs.....	58
3. La modulación muscarínica de las IPSCs es insensible a bloqueadores de los receptores glutamatérgicos.....	61
4. Efecto de la atropina sobre la potenciación de las IPSCs provocada por la activación de mAChRs.....	63
5. La potenciación muscarínica de las IPSCs no está relacionada con la activación postsináptica de receptores metabotrópicos.....	66
6. La aplicación de MCho induce un incremento de la liberación cuantal de GABA.....	68
7. MCho no afecta postsinápticamente a la cinética de las corrientes GABA _A	72
8. Papel de los receptores M1 en la potenciación de IPSCs ejercida por MCho.....	72
9. Papel de los receptores M2-M5 en la potenciación ejercida por MCho.....	74
10. Implicación de la ruta fosfolipasa C / IP ₃ en el aumento de las IPSCs inducido por MCho.....	78
11. MCho deprime la funcionalidad de los canales de	

calcio dependientes de voltaje.....	82
12. MCho actúa selectivamente sobre autapsis GABAérgicas.....	85
13. Efecto de la aplicación de MCho sobre las corrientes GABAérgicas generadas por la aplicación de un pulso de corriente en una fibra aislada.....	89
14. MCho reduce la depresión provocada por la aplicación de pares de pulsos.....	93
15. MCho reduce la probabilidad de liberación de neurotransmisor sin modificar el tamaño del contingente vesicular listo para liberación.....	95
16. Colaboración específica de los subtipos de CCDV de alto umbral en la liberación de GABA al estimular una fibra aislada.....	97
17. La aplicación de MCho aumenta la velocidad de reciclado vesicular tras la aplicación de un tren largo a 8 Hz.....	99
V. DISCUSIÓN.....	102-115
1. Los agonistas colinérgicos aumentan la excitabilidad de las neuronas de hipocampo.....	105
2. MCho ejerce su efecto a nivel presináptico.....	106
3. Los receptores M2-M5 y sus mecanismos efectores son los responsables de la potenciación de IPSCs inducida por MCho.....	108
4. La activación de los mAChRs reduce las corrientes GABAérgicas generadas en autapsis y en fibras aisladas reduciendo la depresión por pares de pulsos.....	110
5. La activación de los mAChRs facilita la respuesta de las sinapsis inhibidoras ante estímulos a frecuencia <i>theta</i> y <i>gamma</i>	111
6. MCho inhibe selectivamente los CCDV implicados en la liberación de GABA.....	113
VI. CONCLUSIONES.....	116
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	117-135

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AC: adenilato ciclasa	IP₃: inositol trifosfato
ACh: acetilcolina	IPSC: corriente postsináptica inhibitoria
AChE: acetilcolinesterasa	I_{ss}: corriente estacionaria
AChR: receptor colinérgico	LTD: depresión a largo plazo
AMPA: ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico	LTP: potenciación a largo plazo
AMP_c: adenosín monofosfato cíclico	mAChR: receptor muscarínico de acetilcolina
BSA: albúmina de suero bovino	MCho: metacolina
CA: <i>cornu ammonis</i>	mPSC: corriente postsináptica miniatura
CCDV: canales de calcio dependientes de voltaje	n: tamaño muestral
ChAT: colina acetil transferasa	nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina
CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona	NMDA: N-metil D-aspartato
DAG: diacilglicerol	PA: potencial de acción
D-AP5: ácido D(-)-2-amino-5 fosfonoalérgico	PBS: tampón fosfato salino
DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco	PDE: fosfodiesterasa
DMSO: dimetilsulfóxido	PIP₂: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
EGTA: ácido 5 etilen glicol-bis (2 aminoetileter) N, N, N', N' tetraacético	PKA: proteína cinasa A
EPSC: corriente postsináptica excitadora	PKC: proteína cinasa C
E.S.M.: error estándar de la media	PLC: fosfolipasa C
FBS: suero bovino fetal	PPD: depresión por pares de pulsos
GABA: ácido γ-aminobutírico	PPR: relación de pares de pulsos
GDP: guanosín difosfato	PSC: corriente postsináptica
GTP: guanosín trifosfato	PTD: depresión post-tetánica
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina etano sulfónico	QX-314: N-etil bromuro de lidocaína
I_{Ca}: corriente de calcio somática	RRP: contingente vesicular listo para liberación
I_{GABA}: corriente de cloruro	SNC: sistema nervioso central
	TEA: tetraetilamonio
	TTX: tetrodotoxina
	V_m: potencial de membrana

INTRODUCCIÓN

1. LA SINAPSIS COLINÉRGICA.

La transmisión intracelular de señales constituye un proceso fundamental en el funcionamiento de un ser vivo. Los receptores que reciben y transmiten dichas señales juegan un papel clave en este proceso. Históricamente, los fundadores del concepto de receptor fueron el fisiólogo inglés John Newport Langley (1852-1925), y el inmunólogo alemán Paul Ehrlich (1854-1915). Desde que Ehrlich introdujo en 1900 el término receptor para sustituir el de “cadena lateral” fijadora de toxinas, y Langley en 1905 propusiera el de “sustancia receptiva” para definir el sitio al que se une una molécula (la nicotina) con el fin de producir una respuesta fisiológica, el concepto de receptor ha progresado de forma espectacular hasta alcanzar el papel crucial que hoy ostenta en la neurobiología (para una perspectiva histórica del concepto de receptor véase Maehle y col., 2002).

Desde un punto de vista fisiológico los receptores son aquellas moléculas de la célula, de naturaleza proteica, a las que se unen de forma específica los neurotransmisores, mediadores u hormonas, generándose a partir de esa unión una respuesta funcional. Desde un punto de vista farmacológico, un receptor es aquella molécula con la que un fármaco interactúa para originar una modificación celular de la que se deriva un determinado efecto.

En esta tesis estudiaremos el efecto de la activación de los receptores colinérgicos en las sinapsis que realizan las interneuronas hipocampales.

1.1. Principales vías colinérgicas.

Una sinapsis colinérgica es aquella cuya función neurotransmisora de información se lleva a cabo por la acetilcolina a través de sus receptores nicotínicos y muscarínicos. Las sinapsis colinérgicas están ampliamente distribuidas, tanto a nivel del sistema nervioso central como periférico. En el cerebro, las neuronas colinérgicas se agrupan en una decena de poblaciones. Las mejor estudiadas son las del núcleo basal de Meynert en humanos (núcleo basal magnocelular, banda diagonal de Broca y área del septum medial en mamíferos inferiores) y áreas adyacentes, que proyectan sus axones, de forma amplia, a la corteza cerebral y al hipocampo (figura 1). La neurotransmisión colinérgica modula la transmisión glutamatérgica y GABAérgica en el hipocampo, y las proyecciones

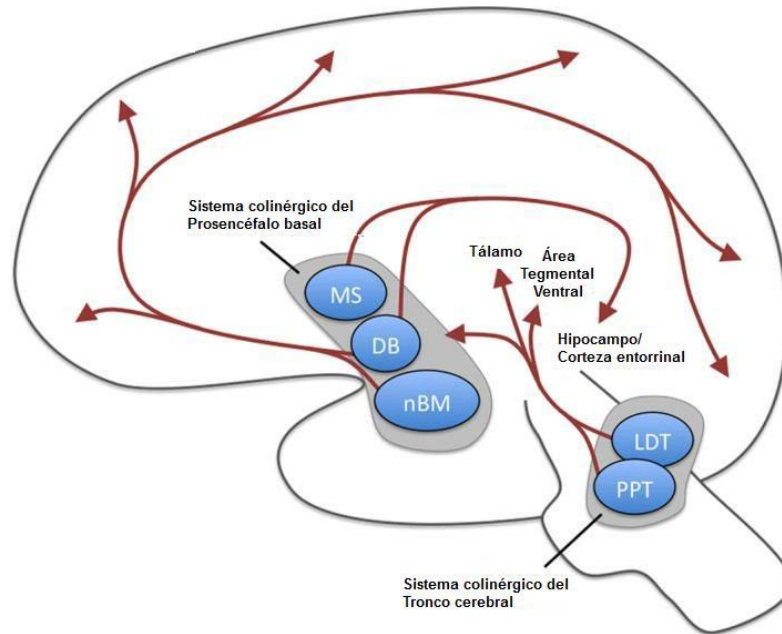


Figura 1. Principales proyecciones colinérgicas en el sistema nervioso central. Existen dos proyecciones principales: la de los núcleos magnocelulares del prosencéfalo basal y las proyecciones del tronco encefálico. La primera incluye el núcleo del septum medial (MS), los núcleos de la banda diagonal de Broca (DB) y el núcleo basal magnocelular (nBM). La proyección del tronco cerebral parte del núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPT) y del tegmento pontino laterodorsal (LDT). Modificado de Newman y col., 2012.

colinérgicas dentro del hipocampo regulan el ritmo theta *in vivo* (para revisión Kimura, 2000). También existen interneuronas colinérgicas de las cuales las mejor caracterizadas están en el estriado (Levey y col., 1984), aunque también están presentes en estructuras como el hipocampo (Frotscher y col., 1986).

1.2. Biosíntesis y degradación de la acetilcolina.

La acetilcolina (ACh) se conoce como un compuesto señalizador endógeno desde su descubrimiento en 1914 por Henry H. Dale y Otto Loewi. La síntesis de ACh se produce en el citoplasma a través de un solo paso enzimático catalizado por la acetil-CoA transferasa (ChAT) que se sintetiza en el soma y es transportada a la membrana de las vesículas sinápticas y a las cercanías de los terminales neuronales (Albuquerque y col., 2009). La ChAT es la encargada de incorporar a la colina el grupo acetil-CoA. La acetil-CoA se sintetiza a nivel mitocondrial, mientras que la colina puede provenir de distintas fuentes siendo la principal de ellas la dieta. Esta enzima se ha purificado y clonado de diferentes fuentes (Bellier y Kimura, 2011) y gracias a ella se ha podido estudiar de

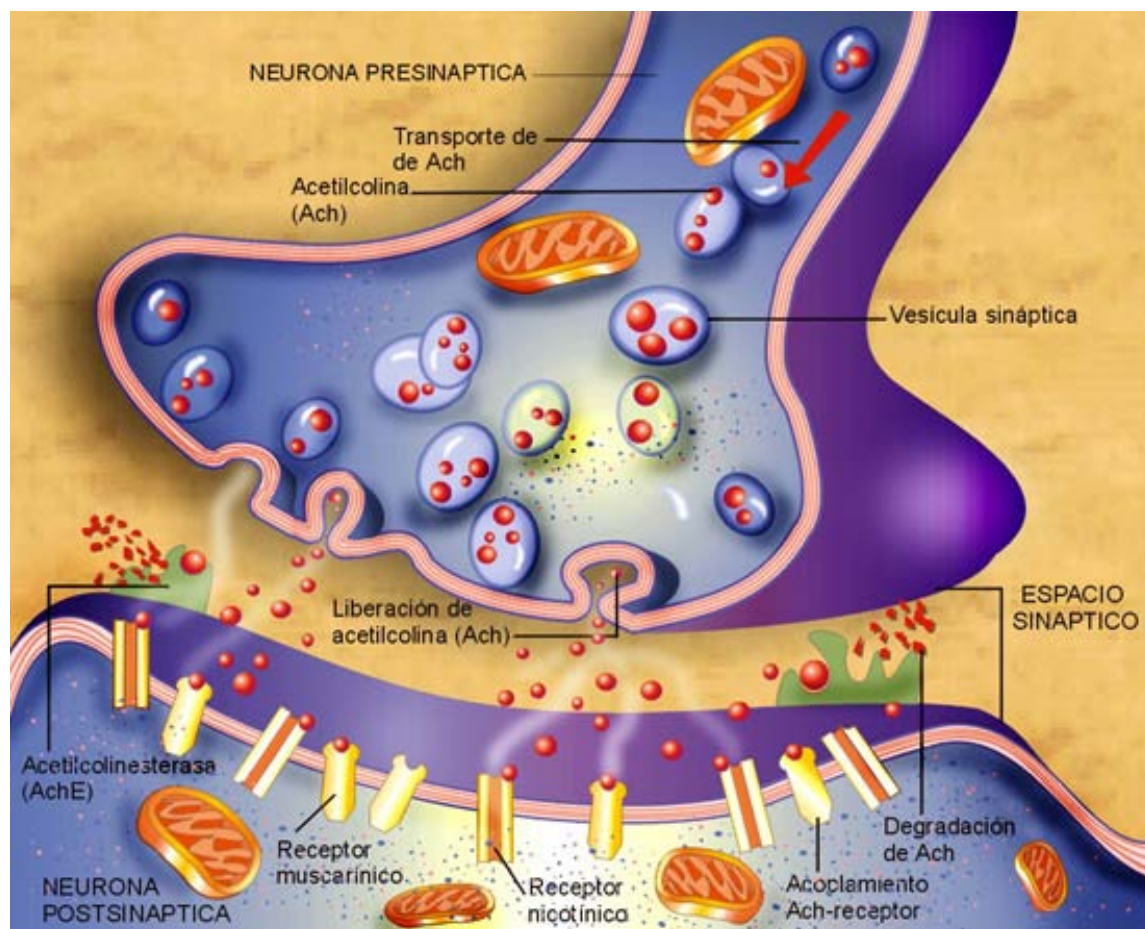


Figura 2. *Esquema de una sinapsis colinérgica.* La liberación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) por parte de la neurona presináptica al espacio extracelular produce la activación de los receptores nicotínicos y muscarínicos presentes en la neurona postsináptica, propagando de este modo la señal de neurona a neurona. Imagen publicada con permiso del Dr. José Villa Prado.

forma detallada la distribución de las vías colinérgicas cerebrales, ya que se encuentra localizada únicamente en neuronas colinérgicas (figura 1).

La ACh se encuentra en los terminales presinápticos principalmente de tres maneras diferentes: asociada a membrana, libre en el citoplasma o, de forma más abundante, almacenada dentro de vesículas (Ira, 2008).

Existen diversas enzimas que hidrolizan la ACh (figura 2 y 3). En base a la especificidad de sustrato se dividen en acetilcolinesterasas y butirilcolinesterasas o pseudocolinesterasas. En las sinapsis colinérgicas, la acetilcolinesterasa se encuentra a nivel pre y postsináptico (Silman y Sussman, 2005), mientras que la butirilcolinesterasa se localiza a nivel plasmático (Hahn y col., 1993) y en las células gliales cercanas (Vernadakis y col., 1976). Ambas enzimas son capaces de degradar hidrolíticamente la

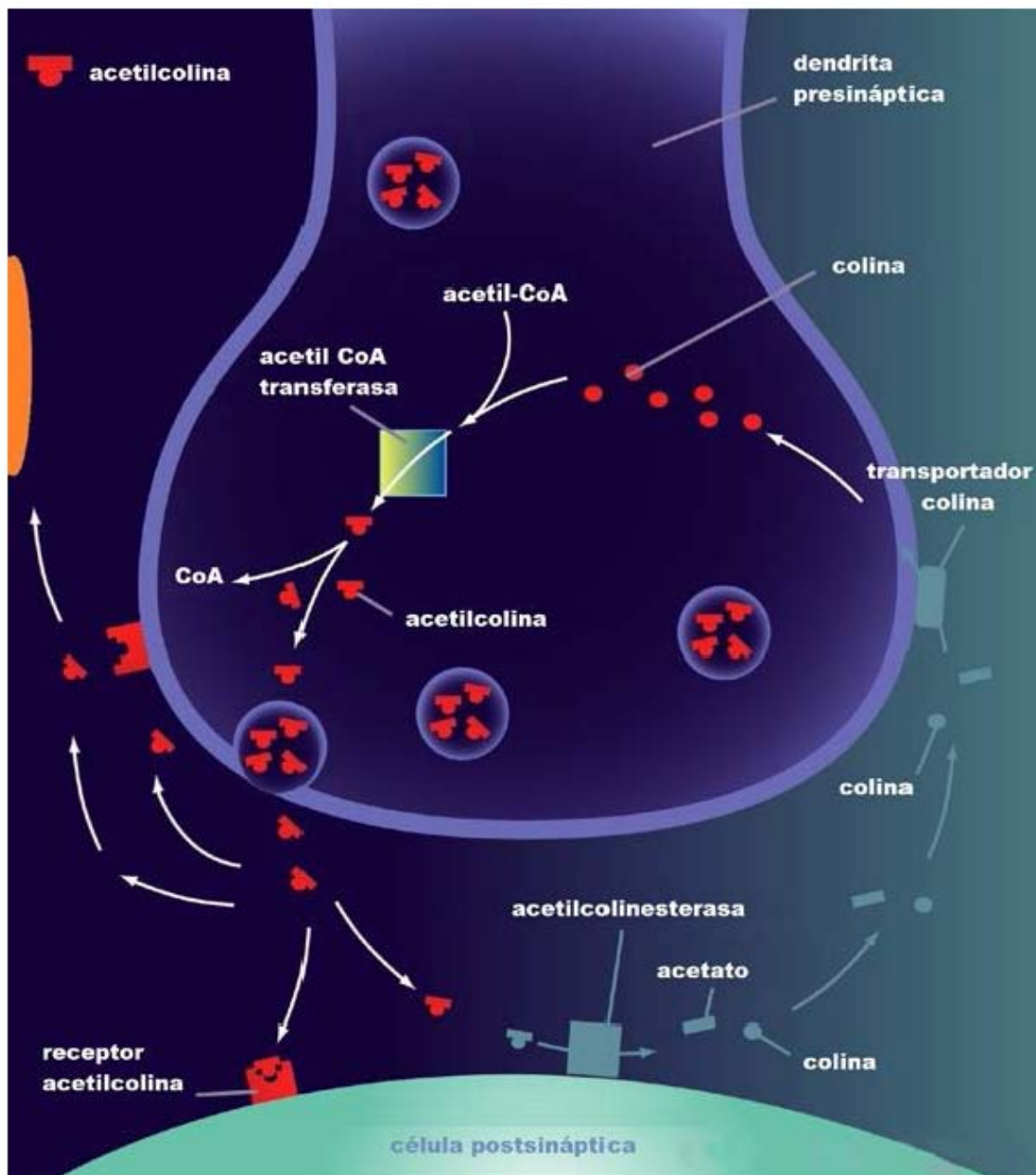


Figura 3. Esquema de la síntesis y degradación de la acetilcolina. La acetil-CoA-transferasa es la enzima encargada de la síntesis de ACh a partir de colina y acetil-CoA. La acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa se encargan de degradar la ACh en acetato y colina que son recicladas para la formación *de novo* de ACh. Modificado de Hardman y col., 2001.

ACh en pocos milisegundos (Anglister y col., 1994; Nair y col., 1994; Tai y col., 2003) previniendo de una posible desensibilización del receptor debido a una presencia mantenida del neurotransmisor en la hendidura sináptica (Mesulam, 2004b).

1.3. Receptores para acetilcolina.

La familia de receptores para acetilcolina (AChRs) o receptores colinérgicos está constituida por dos subfamilias de receptores: los receptores nicotínicos (nAChRs) y los receptores muscarínicos (mAChRs).

1.3.1. Receptores nicotínicos.

Los receptores nicotínicos (nAChRs) son receptores ionotrópicos que forman un canal con un trasiego rápido de cationes. Concretamente, los receptores nicotínicos permiten el paso a su través de iones Na^+ principalmente, aunque también permean para Ca^{2+} y K^+ . Estos receptores son sensibles a la activación por el alcaloide nicotina, procedente de *Nicotiana tabacum*, que produce la apertura del canal iónico en el rango de microsegundos a submicrosegundos. El conocimiento adquirido de estos receptores fue posible gracias a dos singularidades biológicas (Lindstrom y col., 1979; Noda y col., 1982; Noda y col., 1983; Popot y Changeux, 1984; Karlin y col., 1986; Albuquerque y col., 1995). La primera de ellas fue la estrategia de caza de los peces del género *Torpedo*. Estos peces y en concreto *Torpedo marmorata*, tienen un órgano eléctrico que produce un pulso eléctrico que aturde a la presa facilitando así su captura. La densidad de receptores nicotínicos en esta estructura es tal que está cercana a la densidad de cristalización de estas estructuras proteicas. La segunda fue el descubrimiento de la α -bungarotoxina, un componente del veneno de la cobra taiwanesa o krait (*Bungarus multicinctus*). Esta toxina tiene la capacidad de bloquear algunos subtipos de receptores nicotínicos, como es el muscular, con una afinidad cercana a la covalencia, inhibiendo así su función y promoviendo la parálisis de la unión neuromuscular, para más detalles ver (Albuquerque y col., 2009).

A grandes rasgos, los receptores nicotínicos para acetilcolina se pueden dividir en dos grupos. Los nAChRs musculares, presentes en la placa motora, consistentes en 5 subunidades: $\alpha 1$ y 4 subunidades no α ($\beta 1$, γ , δ y ϵ) y los nAChRs neuronales de igual forma compuestos por 5 subunidades en combinación de subunidades α y β con al menos 2 subunidades α . Se pueden construir dos receptores musculares con estas subunidades los compuestos por $\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ o $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ con una estequiometría 2:1:1:1. El nivel de expresión de las subunidades γ y ϵ está basado en la innervación muscular siendo

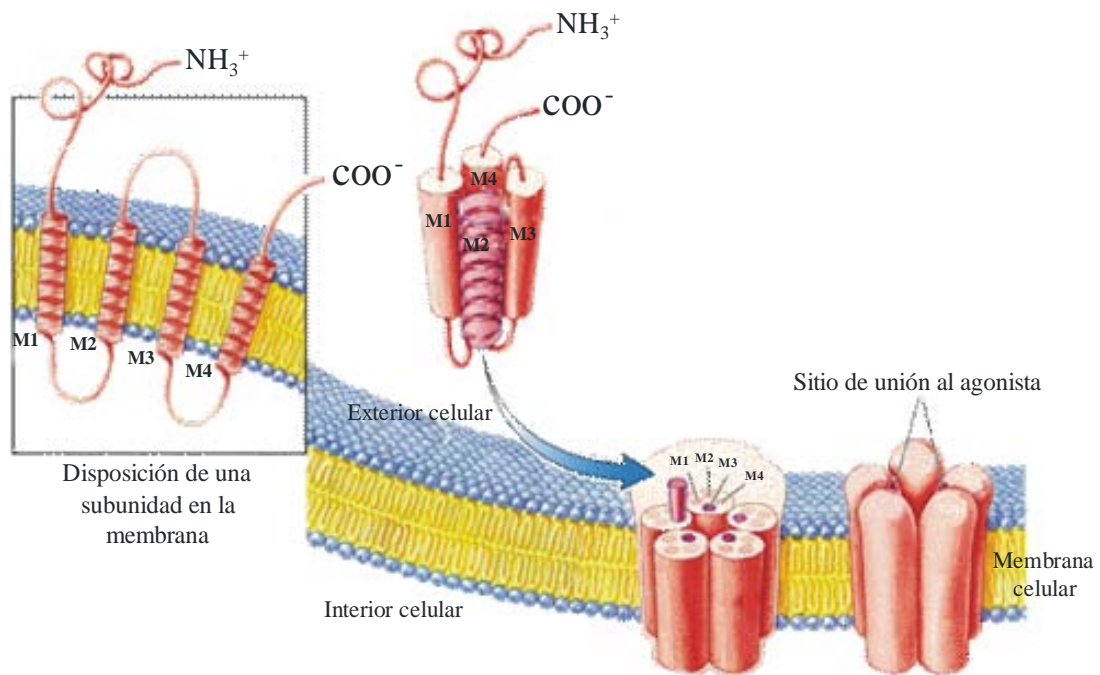


Figura 4. Plegamiento y acoplamiento de las subunidades del receptor nAChR neuronal. M1, M2, M3 y M4: segmentos transmembrana de la subunidad; NH_3^+ : extremo amino terminal; COO^- : extremo carboxilo terminal. Adaptado de Ira, 2008.

la configuración $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$ la presente en músculos no inervados (situación fetal) y la $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ la configuración en sinapsis neuromusculares maduras.

Los nAChRs son pentámeros de 5 subunidades dispuestas de tal modo que forman un canal que permite el paso de iones a su través. Cada subunidad posee cuatro segmentos transmembrana o TM (siendo el segundo de ellos el que estaría conformando el poro del canal por las propiedades anfipáticas de los aminoácidos que lo conforman), un dominio amino-terminal largo y un dominio carboxilo-terminal corto (ambos extracelulares) y un gran dominio intracelular comprendido entre TM3 y TM4 en el que se disponen diferentes sitios de fosforilación (figura 4).

También es común para algunas de las subunidades de esta extensa familia de canales iónicos operados por ligando la presencia en el primer dominio extracelular de un lazo de cisteínas (Cys), definido por dos Cys separadas en mamíferos por 13 aminoácidos. Las subunidades se clasifican, por tanto, en α y no α por la presencia o ausencia de este lazo cerca de la entrada del TM1.

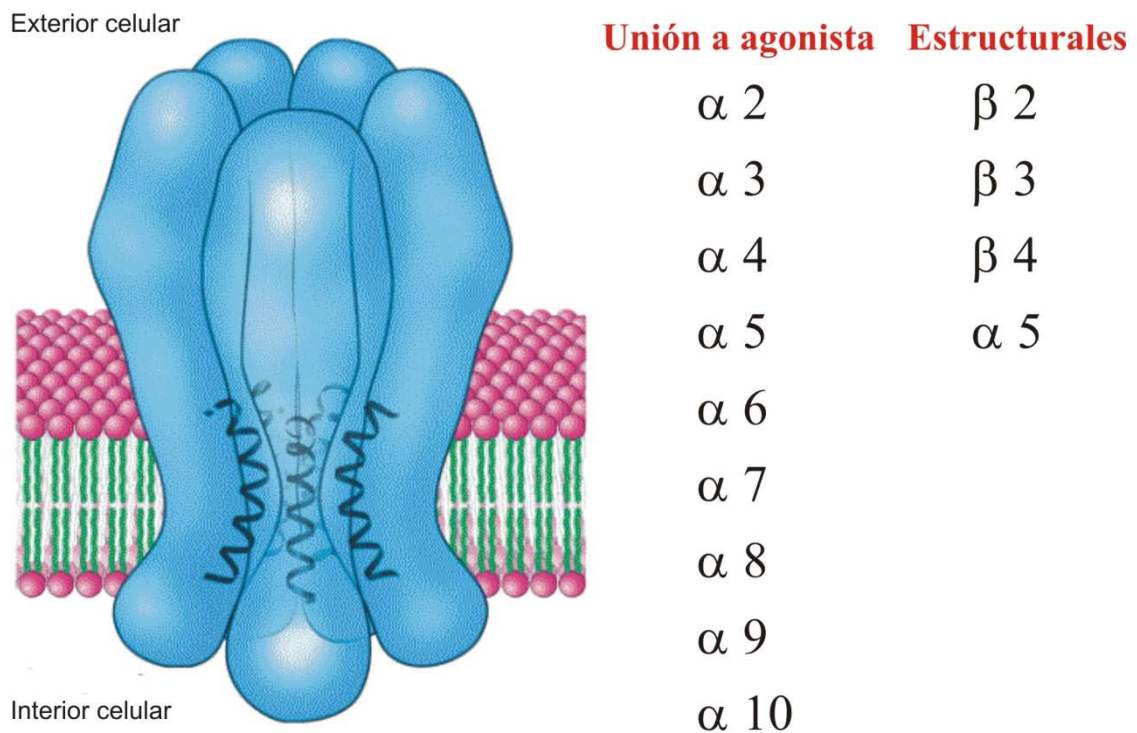


Figura 5. Esquema representativo de la estructura del receptor nicotínico neuronal. Listado de subunidades del receptor nicotínico neuronal estructurales y de unión a agonista.

Los nAChRs neuronales pueden ser homopentaméricos o heteropentaméricos. A día de hoy se han clonado 9 subunidades α neuronales (α 2 - α 10) y 3 subunidades β (β 2- β 4) (figura 5). Aunque en mamíferos hay que destacar que la subunidad α 8 no ha sido encontrada y sólo está presente en librerías aviares (Hogg y col., 2003; Gotti y Clementi, 2004; Dani y Bertrand, 2007).

Las subunidades α 7 y α 10 (principalmente en cóclea) son las subunidades capaces de formar homopentámeros, siendo los receptores homoméricos α 7 los más ampliamente distribuidos en cerebro de mamíferos. Las subunidades α 2, α 3, α 4 y α 6 necesitan de las subunidades β o de la subunidad α 5 para formar receptores funcionales heteroméricos, con una estequiometría habitual (α)2(β)3 (Rae y col., 1991).

Aunque las subunidades β carecen de las Cys del extremo amino terminal, aportan los aminoácidos necesarios para conformar el sitio complementario de unión a ligando. Las subunidades α de los receptores homoméricos forman receptores con cinco sitios de unión a agonista.

En general, la identidad de los aminoácidos presentes en el principal sitio de unión determina la afinidad por el ligando, mientras que los aminoácidos del sitio complementario determina la selectividad. Por tanto, la diversidad de las subunidades que conforman un receptor determinan sus características farmacológicas y consecuentemente su función y distribución anatómica (Tabla 1). Un ejemplo de esto es el receptor homomérico $\alpha 7$.

Los receptores compuestos por subunidades $\alpha 7$ se conocen por desensibilizar rápidamente y por tener un ratio de permeabilidad $\text{Ca}^{2+}:\text{Na}^{+}$ tres o cuatro veces mayor que otros nAChRs (Albuquerque y col., 1995; Castro y Albuquerque, 1995; Quik y col., 1997; Broide y Leslie, 1999), que podría desencadenar incluso algunos mecanismos calcio dependientes, incluyendo la activación de rutas de segundos mensajeros (Morley y Happe, 2000; Suzuki y col., 2006).

Los subtipos de receptores nicotínicos neuronales están constituidos por una combinación de subunidades que constituyen un complejo receptor-canal con variadas características funcionales y farmacológicas. Esta diversidad estructural y funcional y un amplio espectro de localización (somatodendrítica o presináptica, preterminal, en el terminal axónico o postsináptica, o no sináptica en axones mielinizados) confieren a estos receptores un importante papel modulador en el correcto funcionamiento del cerebro de los mamíferos. Los receptores nicotínicos presinápticos y preterminales potencian la liberación de neurotransmisor (Albuquerque y col., 1997; Alkondon y col., 1997; Guo y col., 1998; Garduno y col., 2012), los receptores nicotínicos postsinápticos contribuyen

Tabla 1. Farmacología de los receptores nicotínicos neuronales.

Agonistas no selectivos	Antagonistas no selectivos	Moduladores alostéricos no selectivos
5-I-A85830	α -conotoxina MII	Codeína
ABT-418/ABT-089	Clorisondamina	Fisostigmina
Acetilcolina	Dihidro- β -eritroidina	Galantamina
Anabaseína	D-tubocuranina	Ivermectina
Anatoxina	Erisodina	
Carbacol	Hexametonio	
Dimetilfenilpiperazinio	Mecamilamina	
Epibatidina	Trimetafán	
Lobeína		
Nicotina		
Agonistas selectivos $\alpha 7$	Antagonistas selectivos $\alpha 7$	Moduladores alostéricos selectivos $\alpha 7$
4-OH-GTS-21	α -bungarotoxina	5-OH-indol
AR-R17779	α -conotoxina ImI	PNU-120596
Colina	Metilcaconitina	
GTS-21		
PNU-282987		

en pequeña medida en la transmisión excitatoria rápida (Alkondon y col., 1998; Frazier y col., 1998a; Hefft y col., 1999) y los receptores nicotínicos no sinápticos modulan muchos sistemas de neurotransmisión que influyen en la excitabilidad neuronal (Jones y Yakel, 1997; Alkondon y col., 1999; Ji y Dani, 2000). Los receptores nicotínicos están implicados en la plasticidad sináptica (Ge y Dani, 2005) y en el desarrollo (Aramakis y Metherate, 1998) y los diversos mecanismos nicotínicos participan en los procesos de aprendizaje, memoria y atención (Levin y col., 2006). La disminución, desaparición o alteración de los mecanismos colinérgicos nicotínicos están descritos para numerosas patologías como son la epilepsia, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, autismo, demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Alzheimer y la adicción (Champtiaux y col., 2003; Dani y Bertrand, 2007).

1.3.2. Receptores muscarínicos.

Los receptores muscarínicos (mAChRs) pertenecen a la gran familia de receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a diferentes proteínas con acción enzimática GTPasa (Smith, 2003) y se les conoce como receptores acoplados a nucleótidos de guanina o receptores acoplados a proteína G (Christopoulos, 2007). Se clasifican según el criterio de ser activados por muscarina, un alcaloide procedente del hongo *Amanita muscaria*, y ser bloqueados por atropina, igualmente un alcaloide extraído de un arbusto perteneciente a la familia de las Solanaceae, *Atropa belladonna*. La activación de este subtipo de receptores es relativamente lenta, estando en el rango de milisegundos a segundos (Caulfield y Birdsall, 1998).

Los receptores acoplados a proteínas G forman parte integral de la membrana plasmática y estructuralmente son glicoproteínas de siete segmentos transmembrana constituidos por hélices de aproximadamente 24 aminoácidos (figura 6). Los segmentos transmembrana se organizan formando un anillo en cuya parte interna se agruparían diferentes aminoácidos hidrofílicos. La unión entre segmentos se da por medio de secuencias de aminoácidos que forman distintos bucles intracelulares (i1-4) o extracelulares (e1-4). A su vez encontramos en la cara citoplasmática de la membrana el extremo carboxilo terminal, estando el extremo amino terminal orientado al ambiente extracelular. Es de destacar que el segmento responsable del acoplamiento del receptor

transmembrana a la proteína G efectora, sería el bucle intracelular i3, aunque el segmento

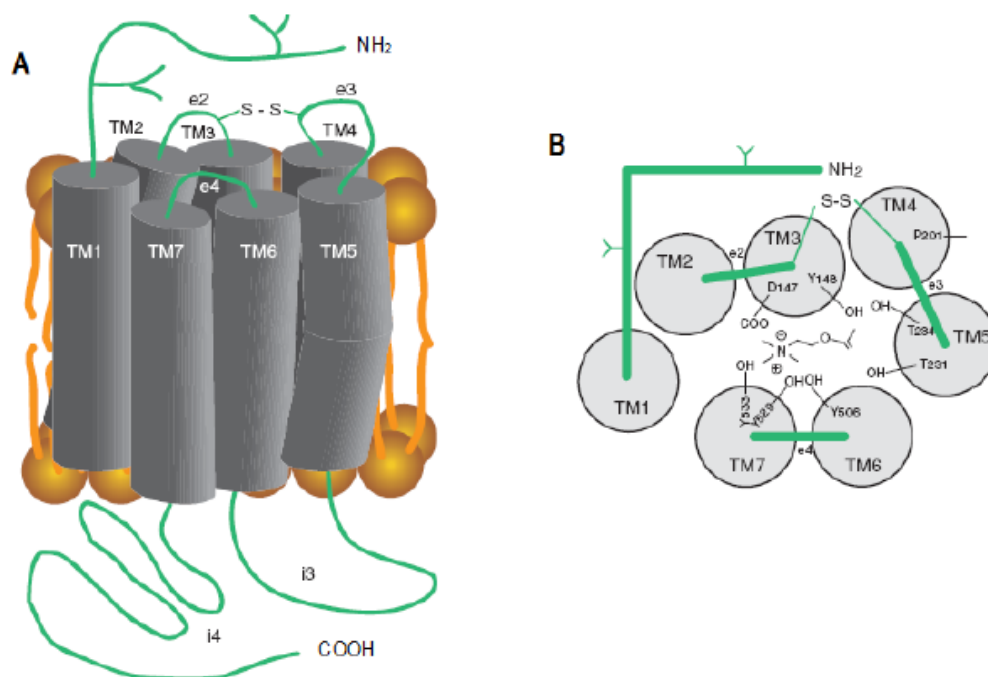


Figura 6. Esquema de la estructura del receptor muscarínico de acetilcolina. **A.** Vista lateral de los 7 segmentos transmembrana. Se observan los bucles intracelulares y extracelulares así como los extremos amino y carboxilo terminales. **B.** Vista superior del modelo esquemático del receptor muscarínico de acetilcolina donde se pueden observar los residuos importantes para la unión a ligando. Adaptado de Christopoulos, 2007.

responsable de la especificidad del acople sería el extremo carboxilo terminal.

Existen cinco subtipos de receptores muscarínicos clonados a partir del descubrimiento de sus respectivos genes (Bonner y col., 1987; Bonner y col., 1988). La nomenclatura recomendada tanto para los genes como para las proteínas codificadas por los mismos sería M1-M5 (Caulfield y Birdsall, 1998). Las mayores diferencias observadas entre estos cinco subtipos de receptores se encuentran en el bucle i3, que permite dividir esta familia de receptores acoplados a proteínas G en dos subfamilias: la familia M1, compuesta por los receptores M1, M3 y M5 y la familia M2, compuesta por los receptores M2 y M4, lo que determina las preferencias específicas de acoplamiento entre estos dos grupos.

La clasificación de los subtipos de mAChRs se fundamenta también en la utilización de antagonistas selectivos (ver tabla 2). La utilización de la selectividad de antagonistas como criterio de clasificación, en lugar de los habitualmente usados

agonistas, es debido a la existencia de una mayor correlación entre los antagonistas y el subtipo de mAChR. El uso de agonistas no permite diferenciar farmacológicamente a los mAChRs debido a la escasa selectividad de los mismos, a la homogeneidad del sitio ortostérico de unión a agonista y que esta unión puede modificar la asociación del receptor con la proteína G (Wess y col., 2007).

A vista de estos datos mostrados en la tabla 2, el uso de los antagonistas como criterio de clasificación tampoco evidencia inequívocamente los efectos de un único subtipo de mAChRs (Heinrich y col., 2009).

Por tanto podemos definir a los receptores del subtipo M1 como aquellos que muestran una elevada afinidad para pirenzepina; los M2 muestran una elevada afinidad por tripitramina, metoctramina e himbacina; los M3 poseen una elevada afinidad por 4-DAMP. Los mAChRs del subtipo M4 son difíciles de catalogar farmacológicamente aunque se pueden diferenciar gracias a la toxina muscarínica MT3, componente del

Tabla 2. Constantes de afinidad de antagonistas (valores de pK_b) para los diferentes subgrupos de mAChRs de mamíferos. Adaptado de Caulfield y Birdsall, 1998; Eglen y col., 2001.

ANTAGONISTA	SUBTIPO DE RECEPTOR MUSCARÍNICO				
	M1	M2	M3	M4	M5
Atropina	9,0-9,7	8,8-9,3	8,9-9,8	8,9-9,6	8,9-9,7
Pirenzepina	7,8-8,5	6,3-6,7	6,7-7,1	7,1-8,1	6,2-7,2
Metoctramina	7,1-7,8	7,8-8,7	6,3-7,0	7,4-8,1	6,9-7,2
4-DAMP	8,6-9,4	7,8-8,4	8,9-9,3	8,4-9,4	8,3-9,0
Himbacina	6,8-7,2	7,7-8,3	6,9-7,4	7,5-8,8	6,1-6,3
AF-DX 384	7,3-7,5	8,2-9,0	7,2-7,8	8,0-8,7	6,3
Tripitramina	8,4-8,9	9,4-9,9	7,1-7,8	7,8-8,5	7,3-7,5
Darifenacina	7,5-7,8	7,0-7,4	8,4-8,9	7,7-8,0	8,0-8,1
PD 102807	5,3	5,7-5,8	6,2-6,3	7,3	5,2
AQ RA 741	7,6	8,9	7,5	8,0	6,0
pFHHSiD	7,4-7,7	6,7-6,9	7,7-7,8	7,2-7,5	6,9
MT3 ^a	7,1	<6	<6	8,7-9,0	<6
MT7 ^a	6,7-7,1	<6	<6	<6	<6

^a:Toxinas extraídas del veneno de la mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*) y la mamba negra (*Dendroaspis polylepis*) respectivamente.

veneno de la mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*), aunque muestran una alta afinidad por himbacina.

En cuanto a la diferenciación farmacológica del subtipo de mAChRs M5 es difícil de conseguir, sobre todo conseguir discernir diferencias entre éste y el receptor M3. Esta diferenciación se basa fundamentalmente en la menor afinidad por AQ RA 741 que tiene el receptor M5 (Christopoulos, 2007).

En el sistema periférico, aparte de otros efectos, los receptores muscarínicos median la contracción de la musculatura lisa, la secreción glandular y modulan el consumo cardiaco. En el sistema nervioso central hay numerosas evidencias de que los receptores muscarínicos están implicados en el control motor, la regulación de la temperatura y la memoria. Existe un gran interés en clasificar los diferentes subtipos de receptores muscarínicos en diversas localizaciones, ya que se les atribuye una posible aplicación terapéutica para afrontar diversas patologías como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, asma, dolor y trastornos de la motilidad intestinal, de la función cardiaca y de la vejiga urinaria.

En lo concerniente a esta tesis, la distribución de los diferentes subtipos de mAChRs en las diferentes regiones hipocampales es la siguiente:

- El receptor M1 se puede encontrar en el soma y las dendritas de las neuronas piramidales de la región CA1 y CA3 hipocampales, en las células granulares y en algunas interneuronas dispersas (Buckley y col., 1989; Levey y col., 1995). Además, en las células piramidales de CA1, el receptor M1 co-localiza con receptores NMDA que contienen la subunidad NR1a e interaccionan directamente mediante una ruta de señalización intracelular (Marino y col., 1998).
- M2 está expresado mayoritariamente en interneuronas del *stratum oriens* y del borde del *alveus* y no se encuentra ni en células piramidales ni en células granulares (Levey y col., 1995). Diversos estudios implican al receptor M2 como autorreceptor negativo por su distribución y localización sináptica (Volpicelli y Levey, 2004; Gautam y col., 2006; Wess y col., 2007).
- El receptor muscarínico de tipo M3 está expresado en células piramidales y con una expresión más baja está presente en las células granulares del giro dentado (Gautam y col., 2006).

- La distribución del receptor M4 es similar a la del receptor M3 aunque estudios con animales delecionados para el gen M2 y M4 muestran varias funciones fisiológicas compartidas entre ellos (Wess, 2004).
- En cuanto a la distribución de los receptores M5 está restringida a las células principales de la región CA aunque su nivel de expresión es débil (Vilaro y col., 1994).

Por último, destacar que independientemente de las características farmacológicas y de la distribución de los mAChRs, como hemos mencionado arriba, los receptores muscarínicos se pueden distribuir en dos subfamilias dependiendo de la proteína G efectora a la que están acoplados. En este caso podemos diferenciar la subfamilia de receptores M1, que constaría de los receptores “impares” (M1, M3 y M5), que acoplarían con una proteína G insensible a toxina pertúsica del subtipo $G_{q/11}$; y la subfamilia M2, compuesta por los receptores “pares” M2/M4, asociados íntimamente a una proteína $G_{i/o}$ sensibles a toxina pertúsica.

1.4. Proteínas G.

Los receptores acoplados a proteínas G han recibido su nombre por la capacidad de reclutar, interaccionar y regular la función de diferentes proteínas G o proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina. La característica principal de esta familia de proteínas es que tienen actividad GTPasa, es decir, catalizan la hidrólisis de GTP a GDP. Las proteínas G serían el componente intermedio del complejo receptor-proteína G-efector, transduciendo la señal desde el receptor activado en membrana a una gran variedad de proteínas efectoras intracelulares como pueden ser distintas enzimas, canales iónicos, proteínas reguladoras o incluso proteínas señalizadoras.

Dentro de la familia de proteínas G se puede analizar por separado dos grandes subfamilias: las heterotriméricas, que se tratarán más profundamente por tener un papel importante en la comprensión de esta tesis, y las de bajo peso molecular o monoméricas, formadas por una única cadena proteica.

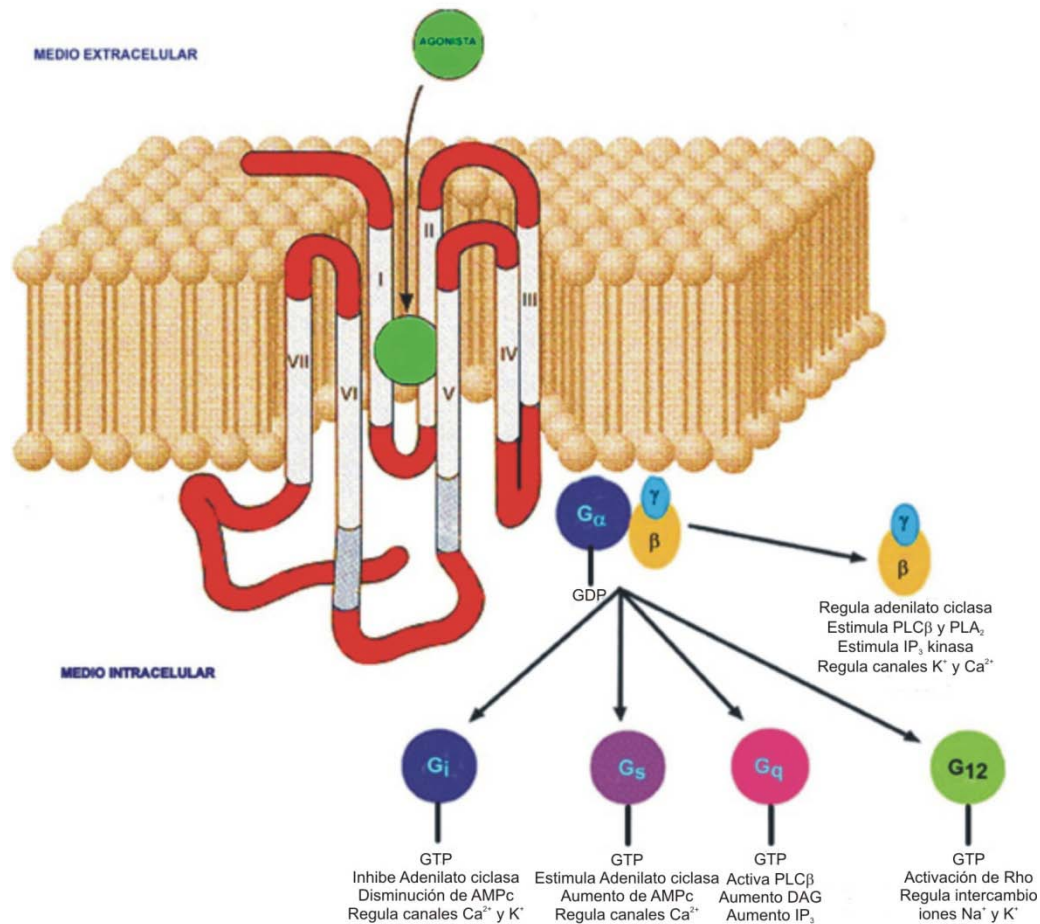


Figura 7. Estructura del receptor metabotrópico de acetilcolina. Conformación de siete segmentos transmembrana (I, II, III, IV, V, VI, VII). La proteína G inactiva en forma de trímero α , β , γ asociada a GDP (guanosín difosfato). Al intercambiarse el GDP por GTP (guanosín trifosfato) se disocia el trímero activándose la subunidad α de la proteína G. Modificado de Weeschureck y Offermanns, 2005.

Se han identificado más de un centenar de proteínas G monoméricas, que se agrupan en varias familias según su similitud estructural (Fredriksson y col., 2003): entre ellas destacan la familia Ras, muy implicada en la señalización y control del crecimiento celular; y la familia *Rho/Rac/Cdc42*, que regula tanto la organización del citoesqueleto como la expresión de genes codificadores de proteínas implicadas en señalización.

1.4.1. Proteínas G heterotriméricas.

En el contexto de esta tesis, la unión de un agonista a un receptor metabotrópico de acetilcolina va a desencadenar la activación de una proteína G heterotrimérica (figura 7). Estas proteínas constan de tres subunidades (α , β y γ) y dependiendo del subtipo de

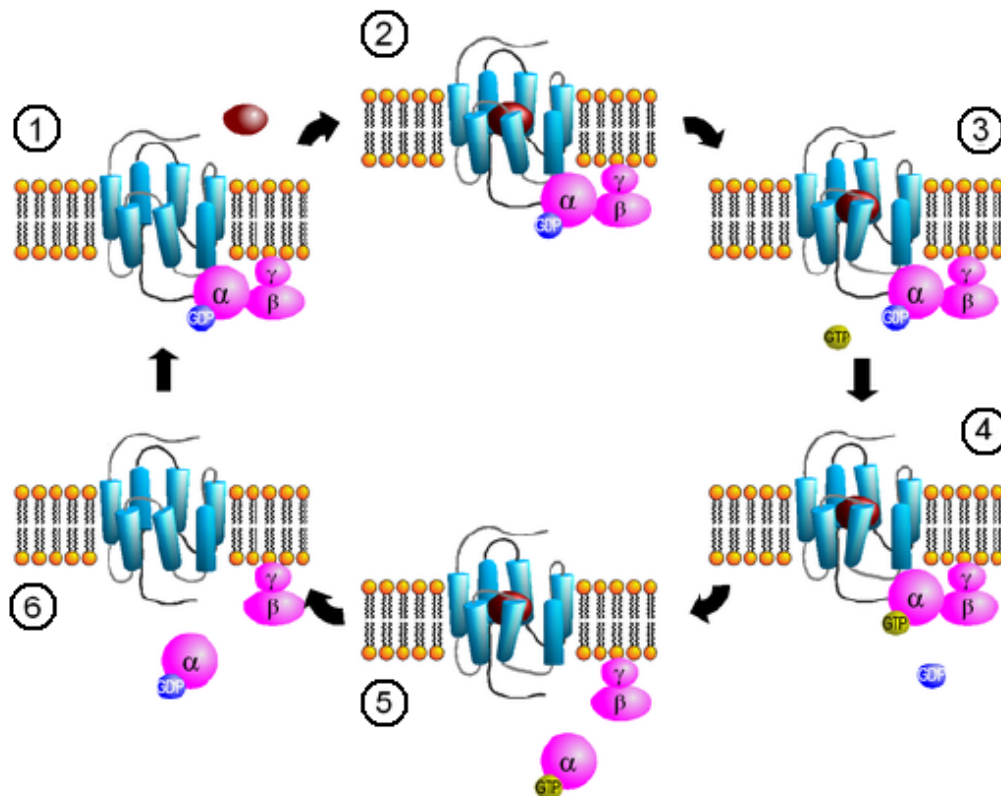


Figura 8. *Secuencia de activación de los receptores acoplados a proteínas G.* 1. Unión del ligando al receptor; 2. Activación de la proteína G; 3. Unión de GTP a la subunidad α ; 4. Desacople de GDP de la subunidad α ; 5. Separación de las fracciones activas (subunidad α unida a GTP y subunidad $\beta \gamma$); 6. Hidrólisis del GTP por la actividad intrínseca GTPasa de la subunidad α , devolviendo al receptor a su configuración heterotrimérica. Modificado de Fredriksson y col., 2003.

receptor muscarínico, la activación de una determinada subunidad α de la proteína G va a provocar una respuesta enzimática efectora, que en este sistema sería la activación de una fosfolipasa de tipo C (PLC) o la regulación de una adenilato ciclasa (AC) (ver en detalle más adelante).

La conformación y la función de las proteínas G oscilan en un círculo de dos estados, el activo y el inactivo (figura 8). En el estado inactivo, las tres subunidades $\alpha\beta\gamma$ de la proteína G están unidas entre sí formando un complejo asociado a la parte intracelular de la membrana, con el GDP unido a la subunidad α . La unión del ligando al receptor promueve cambios conformacionales en el receptor que se transmiten a través de los siete segmentos transmembrana provocando un cambio conformacional en la subunidad α de tal forma que el GDP es desplazado por GTP pasando la proteína G a un estado activo (Bourne y col., 1991). La subunidad α unida a GTP se disocia entonces de

la subunidad $\beta\gamma$ quedando ambas libres para actuar sobre sistemas efectores específicos. La asociación con el efector activa la función GTPasa de la subunidad α hidrolizando el GTP a GDP. Esta hidrólisis provoca un nuevo cambio conformacional que permite la disociación de la proteína α del sistema efector y una reasociación con las subunidades $\beta\gamma$, retornando al estado inactivo nuevamente (Siegelbaum, 1999; Wettschureck y Offermanns, 2005).

1.4.2. Subtipos de subunidades de las proteínas G heterotriméricas.

Las subunidades α definen las propiedades de las proteínas G heterotriméricas y pueden ser divididas en 4 subtipos: α_G , $G_{\alpha_{i/o}}$, $G_{\alpha_{q/11}}$ y $G_{\alpha_{12/13}}$ (ver tabla 3). Cada subtipo consta de varios miembros que a menudo muestran muchos patrones específicos de expresión. Los miembros de un subtipo son estructuralmente similares y frecuentemente comparten algunas de sus propiedades funcionales (Wettschureck y Offermanns, 2005).

El complejo $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas está ensamblado por un repertorio de 5 subunidades β y 12 subunidades γ (tabla 3). Este complejo fue considerado inicialmente como un acompañante pasivo de la subunidad α , aunque ahora está claro que el complejo $\beta\gamma$ una vez liberado de la subunidad α puede regular diversos efectos (Clapham y Neer, 1997), entre los que destacan la regulación de canales iónicos y de algunas isoformas de AC, PLC (Exton, 1996) así como PI3-K (Vanhaesebroeck y col., 2001).

Como anteriormente se ha mencionado, está bien establecido que los mAChRs “impares” están acoplados a proteínas G pertenecientes al subtipo $\alpha_{q/11}$ que activan a una PLC del subtipo β , mientras que los mAChRs “pares” están asociados a una proteína G del subtipo $G_{\alpha_{i/o}}$ que inhibe la función de una AC previamente activada (Felder, 1995).

1.4.3 Fosfolipasa C.

La familia de las fosfolipasas C (PLC) se encuentra formada por un grupo diverso de enzimas que difieren entre ellas en su estructura y distribución tisular. Hasta ahora se han identificado 11 isoenzimas de PLC: 4 PLC β , 2 PLC γ , 4 PLC δ y una PLC ϵ (para una exhaustiva revisión Rhee, 2001).

La activación de PLC por receptores muscarínicos viene mediada por la acción del subtipo de subunidades α del tipo $G\alpha_{q/11}$ y el resultado final aparente de esta activación es la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares sensibles a IP_3 (Berridge, 1995). El sustrato de esta isoenzima es el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2), el cual se forma a

Tabla 3. Subtipo de subunidades de las proteínas G heterotriméricas.

Nombre		Efecto
Subunidad α	Subtipo α_s	$G\alpha_s$ \uparrow AC (todos los subtipos)
		$G\alpha_{sXL}$ \uparrow AC
		$G\alpha_{olf}$ \uparrow AC
	Subtipo $\alpha_{i/o}$	$G\alpha_{i1}$ $G\alpha_{i2}$ $G\alpha_{i3}$ \downarrow AC (tipo I, III, V, VI, VIII, IX)
		$G\alpha_o$ \downarrow Canales de Ca^{2+} voltaje dependientes \uparrow GIRK
		$G\alpha_z$ \downarrow AC (tipo V, VI)
		$G\alpha_{gust}$ \uparrow PDE (?)
		$G\alpha_{t-r}$ \uparrow PDE 6
		$G\alpha_{t-c}$ \uparrow PDE 6
	Subtipo $\alpha_{q/11}$	$G\alpha_q$ $G\alpha_{11}$ $G\alpha_{14}$ $G\alpha_{15/16}$ \uparrow PLC β 1-4
Subunidad β	Subtipo $\alpha_{12/13}$	$G\alpha_{12}$ $G\alpha_{13}$ PDZ- <i>Rho</i> GEF/LARG, Bkt, GAP 1m, cadherina p115 <i>Rho</i> GEF, PDZ- <i>Rho</i> GEF/LARG, radixina
Subunidad γ		β_1 β_2 β_3 β_4 β_5
		γ_1 γ_{14} γ_2 γ_3 γ_4 γ_5 γ_7 γ_8 γ_{10} γ_{11} γ_{12} γ_{13} \downarrow AC (I), \uparrow AC (II, IV, VII), \uparrow PLC β ($\beta_3 > \beta_2 > \beta_1$), \uparrow GIRK $_{1-4}$, \uparrow PI3-K, \uparrow canales T de Ca^{2+} , \downarrow canales de Ca^{2+} voltaje dependientes de tipo N y P/Q

AC: adenilato ciclasa; GIRK: canales de potasio rectificadores regulados por proteínas G; PDE: fosfodiesterasa; PLC: fosfolipasa C; *Rho*GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina *Rho*.

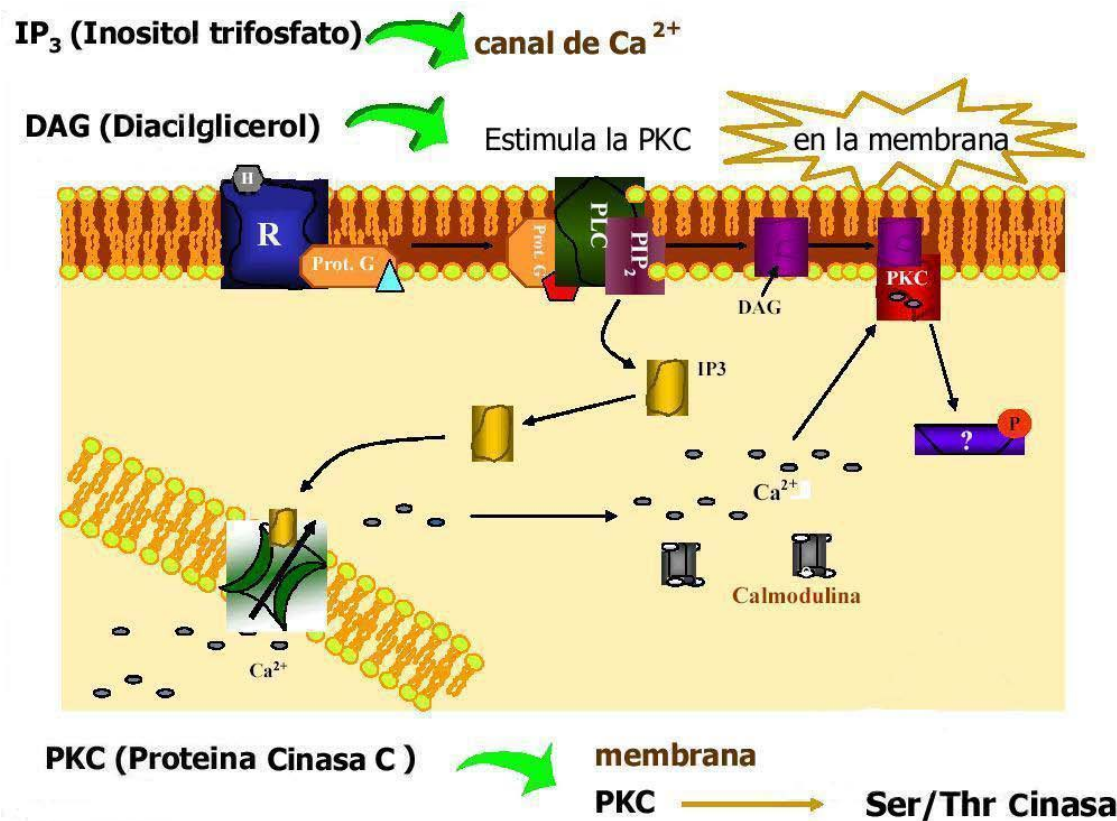


Figura 9. Actuación de DAG e IP₃ como segundos mensajeros. El DAG y el IP₃ constituyen junto al AMPc y el Ca²⁺ las moléculas más utilizadas como segundos mensajeros en las rutas de transducción de señales. El IP₃ actúa regulando un canal de Ca²⁺ anclado en el retículo endoplasmático que actúa favoreciendo el aumento de la concentración de este catión a nivel citoplasmático. El Ca²⁺, entre otras acciones, favorece el anclaje de PKC en la membrana plasmática, donde puede ser activada por DAG. Adaptado de Berridge, 1995.

partir de fosfatidilinositol (PI). Éste se encuentra anclado a la parte interna de la membrana plasmática y requiere de consecutivas fosforilaciones para convertirse en PIP₂. Una vez formado el PIP₂, la PLC de la membrana favorece su ruptura dando origen a dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP₃) (ver figura 9).

El IP₃ tiene una naturaleza hidrosoluble por lo que es capaz de difundir por el citoplasma y llegar a nivel del retículo endoplasmático, donde es capaz de unirse a receptores específicos que actúan como canales iónicos activados por ligando que permiten el trasiego a su través de cationes Ca²⁺ (Schulman y Roberts, 2008). La activación de receptores IP₃ en el hipocampo favorece un aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺, que puede verse incrementada por una activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Power y Sah, 2002).

En cuanto al otro segundo mensajero, el DAG, es una molécula hidrofóbica que se mantiene cerca de la membrana y es capaz de interactuar y activar la PKC dependiente de calcio. La activación de la PKC a nivel neuronal se ha visto asociada a diversos efectos como la síntesis y secreción de neurotransmisores, fosforilación de receptores que alteran su sensibilidad y plasticidad sináptica (Mesulam, 2004a).

1.4.4 Adenilato ciclasa.

Como anteriormente hemos comentado, la activación de la familia M1 de mAChRs determina la regulación en la señalización con diversos segundos mensajeros como son el IP₃, el DAG y el Ca²⁺. En el caso de los mAChRs de la familia M2, el segundo mensajero implicado y cuya regulación es competencia suya es el AMPc.

En el SNC el AMPc participa en diversos procesos fisiológicos entre los que se incluyen la transcripción de genes (Lalli y Sassone-Corsi, 1994), la activación de canales iónicos (Yamashita y col., 1997), la potenciación y facilitación sináptica (Zhong y Wu, 1991), la liberación de neurotransmisores (Kandel y Schwartz, 1982; Chen y Regehr, 1997; Bouron y Reuter, 1999) y los procesos de aprendizaje y memoria (Frey y col., 1993; Silva, 2003; Tully y col., 2003). Por tanto, la concentración de AMPc es un factor importante en su mecanismo de señalización. Por este motivo es necesaria una rápida velocidad de síntesis y degradación, por lo que las enzimas encargadas de estos procesos tienen que estar fuertemente reguladas.

Tabla 4. Clasificación de las adenilato ciclasas de membrana y su regulación por varios moduladores.

Grupo	Isoforma	Activadores	Inhibidores
Grupo 1	AC I	G _{αs} , Fsk, Ca ²⁺ /CaM	G _{αi/o} , CaM cinasa IV, inhibición por (P)
	AC III	G _{αs} , Fsk, Ca ²⁺ /CaM	CaM cinasa II, inhibidores por (P)
	AC VIII	G _{αs} , Fsk, Ca ²⁺ /CaM	Inhibición por (P)
Grupo 2	AC II	G _{αs} , Fsk, βγ, PKC	Inhibición por (P)
	AC IV	G _{αs} , Fsk, βγ	Inhibición por (P)
	AC VII	G _{αs} , Fsk, βγ, PKC	Inhibición por (P)
Grupo 3	AC V	G _{αs} , Fsk, PKC	G _{αi/o} , Ca ²⁺ , PKA, inhibición por (P), βγ
	AC VI	G _{αs} , Fsk	G _{αi/o} , Ca ²⁺ , PKA, PKC, inhibición por (P)
Grupo 4	AC IX	G _{αs}	Calcineurina, inhibición por (P)

AC: adenilato ciclasa, Fsk: forskolina; Ca²⁺/CaM: calcio calmodulina; PKC: proteína cinasa C; PKA: proteína cinasa dependiente de AMPc; inhibición por (P): inhibición por fosforilación.

El AMPc se genera a partir de ATP por la acción de una enzima denominada adenilato ciclasa y se inactiva transformándose en AMP por la acción de enzimas denominadas fosfodiesterasas (PDE). La mayor parte de las acciones del AMPc, desde sus conocidos efectos reguladores de importantes vías metabólicas hasta sus acciones específicas en el SNC, son consecuencia de su capacidad para activar la proteína cinasa A (PKA), que fosforila otras proteínas en restos de Ser y Thr (Taylor y col., 1990).

Hasta el momento se han clonado 10 isoenzimas de la adenilato ciclasa en mamíferos, 9 de ellas de membrana (I-IX) y una citosólica (SAC) (Defer y col., 2000).

Todas las isoformas de membrana son activadas por la subunidad $G\alpha_s$ de las proteínas G heterotriméricas y por el diterpeno forskolina, pero existen marcadas diferencias entre ellas en lo referente a la modulación por otros factores, estando todas reguladas de forma múltiple. En función del mecanismo de regulación se han clasificado a las AC en 4 grupos (ver tabla 4) (Hanoune y Defer, 2001).

La regulación colinérgica de este sistema enzimático de señalización por segundos mensajeros viene mediada por la activación de una proteína $G\alpha_{i/o}$ acoplada a los receptores de la familia M2. De forma general, esta activación finaliza en una disminución de la concentración intracelular de AMPc y por tanto en una pérdida de actividad de la PKA (Santafe y col., 2006).

2. EL HIPOCAMPO.

El estudio de la formación del hipocampo ha despertado la atención de los neurocientíficos por diversas razones, dando como resultado la publicación de más de 90 000 artículos científicos. Entre ellas, su peculiar estructura, altamente organizada, la facilidad que presenta para su estudio electrofisiológico, tanto *in vitro* como *in vivo* y su implicación en los procesos de aprendizaje y memoria, como se deduce de los estudios realizados en el hombre tras su lesión por procesos degenerativos, vasculares o quirúrgicos.

Junto a la amígdala, el área septal, el núcleo accumbens, la habénula, el núcleo anterior del tálamo, parte de los ganglios basales (sustancia innominada y la región palidal ventral), el hipotálamo (como vía común de salida de todo el sistema) y la corteza orbitofrontal, la región hipocampal estaría formando parte del sistema límbico.

El sistema límbico como tal, no sería en sí mismo una estructura anatómica, sino más bien un concepto funcional cuyo papel sería el control y regulación de los estados emocionales y motivacionales y la manifestación comportamental de los mismos. El sistema límbico cumple también un importante papel en la regulación de las funciones metabólicas y vegetativas. En particular, el hipocampo estaría relacionado con los procesos de memoria, almacenamiento de los recuerdos y aprendizaje espacial (Reznikov, 1991; Cardinali, 1992).

Conviene distinguir entre los términos región hipocampal, formación hipocampal, e hipocampo. La región hipocampal se subdivide en dos partes (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934; Blackstad, 1956; Angevine, 1965; Isaacson, 1987):

- la formación hipocampal, consistente en el hipocampo propiamente dicho o asta de Ammon, el giro dentado y el *subiculum* (incluyendo el *prosibuculum*).
- la formación parahipocampal, consistente en el *presubiculum*, el *parasubiculum* (incluyendo el área retopineal) y la corteza entorrinal.

Sin embargo, el término hipocampo es empleado para referirse al asta de Ammon y al íntimamente asociado giro dentado (Isaacson, 1987).

Anatómicamente, el hipocampo recibe señales sensoriales de diversa índole, pero muy alejadas sinápticamente de sus fuentes primarias. Del mismo modo, por sus proyecciones eferentes, también se encuentra muy alejado de los centros motores. Así pues, el hipocampo ocupa un emplazamiento ideal para el análisis no contingente de la información interna y subjetiva que recibe a través de sus aferencias subcorticales.

2.1. Descripción anatómica del hipocampo en mamíferos.

Filogenéticamente, el sistema límbico corresponde a la parte más antigua del telencéfalo y a las estructuras corticales que de él derivan (Cardinali, 1992). En el desarrollo evolutivo desde el paleocortex al neocortex, el hipocampo se considera como el arquicortex intermedio (Shepherd, 1979; Nieuwenhuys y col., 1982).

El hipocampo en mamíferos es el paradigma de la corteza simple, consistente principalmente en un tipo celular básico y sus interneuronas asociadas. Estas neuronas base están empaquetadas en una de las tres capas que conforman el arquicortex (capa polimórfica, capa piramidal y capa molecular), en contraste con las seis capas que estarían formando el neocortex (capa molecular, capa granular externa, capa piramidal externa, capa granular interna, capa piramidal interna o ganglionar y capa fusiforme o multiforme).

Sólo los mamíferos placentarios poseen una formación hipocampal postcallosa bien desarrollada (Angevine, 1975) considerándose como zona homóloga la región medial del palio en anfibios, reptiles y aves y la región lateral del palio en peces.

En la rata, la formación hipocampal se encuentra en la parte medial del lóbulo temporal y está situada profundamente. Por su lado lateral, la formación bordea la pared mediobasal del ventrículo lateral. Como se puede observar en la figura 10, la formación hipocampal está curvada a lo largo de su eje longitudinal (septo-temporal), de manera que la región dorsal se sitúa de forma casi horizontal y la región ventral desciende a la base del cerebro (Blackstad y col., 1970; Hjorth-Simonsen, 1972; Kahle y col., 1988), es decir, asemejaría a una “C”.

El hipocampo en si mismo está dividido en dos sectores perpendiculares a su eje longitudinal con forma de arco, estando el extremo inferior del mayor de ellos incluido en la apertura del más pequeño. El más grande está constituido por las células piramidales del hipocampo propiamente dicho (asta de Ammon) y el más pequeño por las células granulares del giro dentado (figura 11).

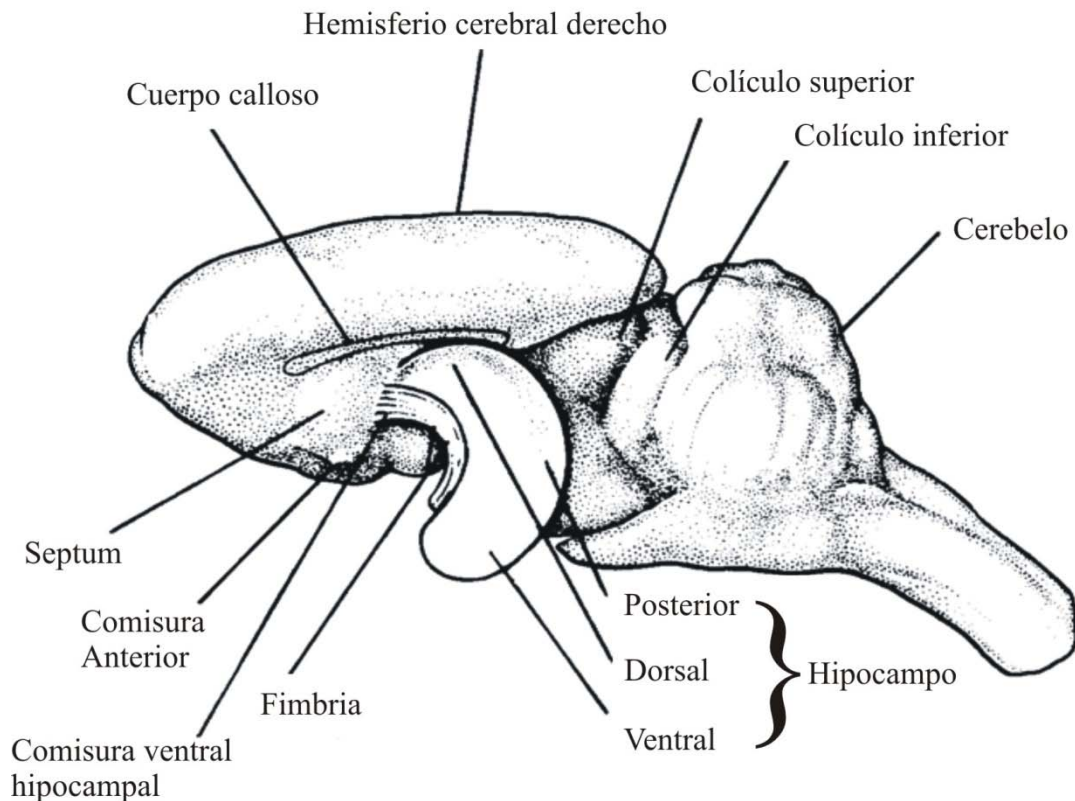


Fig. 10. Dibujo del hipocampo izquierdo de rata. El resto de estructuras del prosencéfalo izquierdo han sido eliminadas. En este animal el hipocampo ocuparía una gran porción del prosencéfalo. Con propósitos descriptivos, el hipocampo puede ser dividido en una región dorsal, encontrándose justo debajo del *septum*, una región posterior donde empieza a doblarse ventral y lateralmente y una región ventral que se encuentra en la región temporal del cerebro. La parte del hipocampo visible en este aspecto dorsal es el hipocampo propiamente dicho, mientras que la *fascia dentata* estaría enterrada dentro y en el fondo de esta superficie. Modificado de Angevine, 1975.

El giro dentado está formado por la *fascia dentata* o giro dentado propiamente dicho y el *hilus*. A su vez la *fascia dentata* se subdivide en dos porciones: la más próxima al arco de piramidales se denomina brazo suprapiramidal y la más alejada brazo infrapiramidal (Isaacson, 1987).

El hipocampo propiamente dicho puede ser dividido más a fondo en base a criterios anatómicos y celulares. A principios del siglo pasado don Santiago Ramón y Cajal (1911) distinguió en roedores dos regiones: una superior y otra inferior, siendo esta última la que contendría la zona de células piramidales grandes. Posteriormente, un estudio morfológico más detallado permitió a Lorente de Nó (1934) dividir el hipocampo en cuatro campos (CA1-4), siendo el significado de CA: *cornu ammonis*. El área CA1 corresponde a la mayor parte de la región superior próxima al *subiculum*, CA2 está

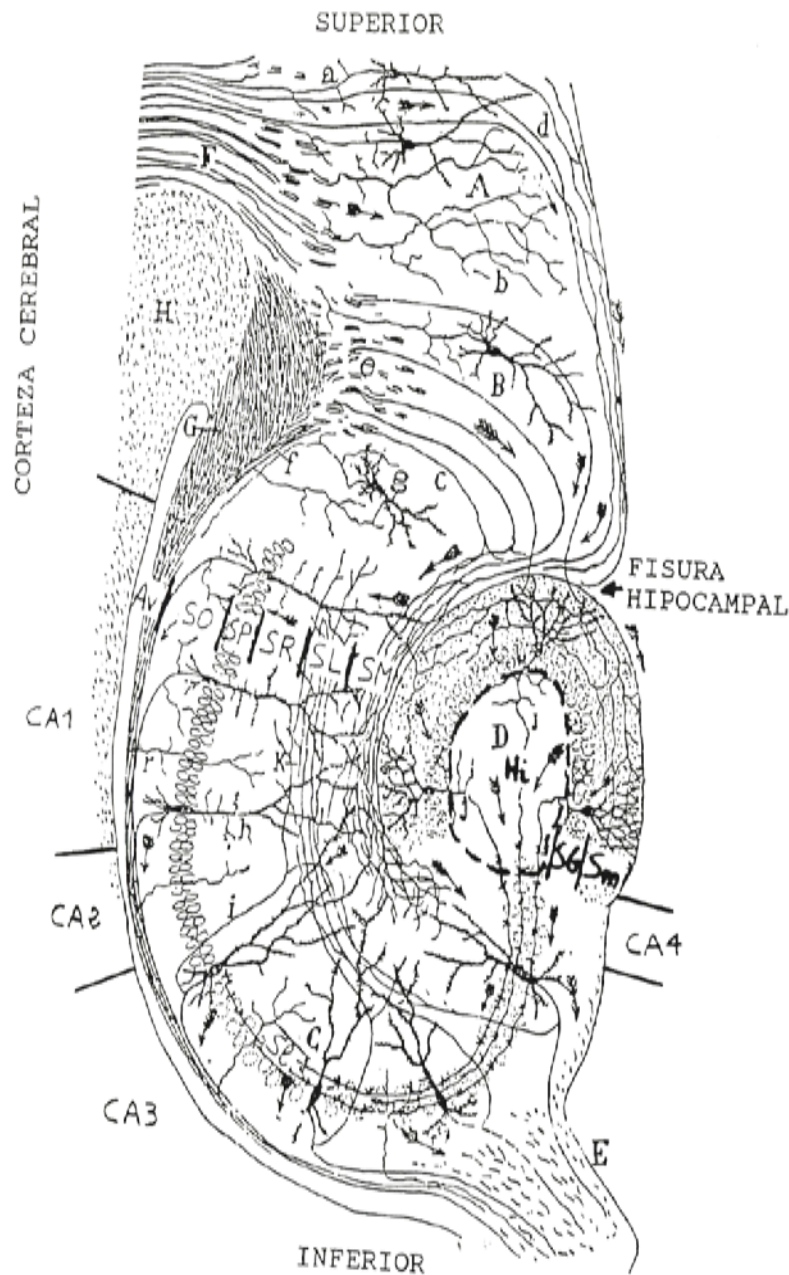


Fig. 11. Esquema de la arquitectura y de las conexiones del hipocampo y giro dentado de rata. **A:** ganglio del extremo occipital; **B:** subiculum; **C:** hipocampo; **D:** giro dentado; **E:** fimbria; **F:** cíngulo; **G:** fascículo angular o tracto temporo-ammónico cruzado; **H:** cuerpo calloso; **K:** colaterales recurrentes resultantes de las células piramidales y entrando al *stratum lacunosum* del hipocampo; **a:** cilindro-eje penetrando en el cíngulo; **b:** fibras del cíngulo terminando en el núcleo del extremo occipital; **c:** fibras temporo-ammónicas perforantes o directas; **d:** fibras perforantes del cíngulo; **e:** plano de fibras temporo-ammónicas superiores; **g:** célula del subiculum; **h:** células piramidales de la región superior del hipocampo; **i:** colaterales ascendentes de las grandes células piramidales; **j:** cilindro-eje de un grano; **r:** colaterales de fibras del alveus. Está remarcado los distintos strata del hipocampo y sus límites (**Av:** alveus; **SO:** stratum oriens; **SP:** stratum pyramidale; **SR:** stratum radiatum; **SL:** stratum lucidum; **SL:** stratum lacunosum; **SM:** stratum moleculare); la subdivisión en áreas del hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4); y las capas del giro dentado (**Sm:** stratum moleculare; **SG:** stratum granulosum; **Hi:** hilus). Modificado de Ramón y Cajal, 1911.

situada cerca de la curva del arco mayor del hipocampo, CA3 ocupa la mayor parte de la región inferior y CA4 situaría a unas células aisladas dentro del *hilus* del giro dentado. Aunque estas células no están alineadas con las células piramidales de CA3, están incluidas en el hipocampo propiamente dicho por presentar unas características similares al resto de células piramidales. Recientemente se ha adaptado esta terminología por criterios de patrones de proyección (Ishizuka y col., 1990) y se considera esta área como componente de la capa polimórfica del giro dentado.

2.2. Estructura y organización del hipocampo y el giro dentado.

La organización estructural del hipocampo y del giro dentado en roedores ha sido estudiada con gran detalle (Ramón y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934; Blackstad, 1956; Laatsch y Cowan, 1966; Blackstad y col., 1970; Hjorth-Simonsen, 1972, , 1973; Amaral, 1978; Stanfield y col., 1979; Stanfield y Cowan, 1979; Gaarskjaer, 1986).

2.2.1. Giro dentado.

Como anteriormente se ha mencionado el giro dentado consta de la *fascia dentata* y el *hilus* y se pueden distinguir 3 capas o *strata* en él:

- *Stratum moleculare*: está situado junto a la fisura hipocampal y contiene las dendritas apicales de las neuronas granulares. A esta capa llegan las fibras de la vía perforante procedentes del área entorrinal lateral. También es la zona de destino de fibras comisurales y asociacionales procedentes del *hilus*. Contiene diversos tipos de interneuronas.
- *Stratum granulosum*: está formado por las células principales del giro dentado, las células granulares, y se sitúa adyacente a la capa molecular. Los axones de estas células forman las fibras musgosas que inervan con colaterales a las células del *hilus* y continúan formando paquetes de fibras hacia las células principales de la capa CA3 del hipocampo. A lo largo de la superficie de la capa granular se encuentran otros tipos de células, la mayoría de ellas interneuronas inhibitorias.

- *Hilus*: también conocido como capa polimórfica. Su principal componente celular son las células musgosas. Éstas son células piramidales modificadas que se introducen en el giro dentado y que serían las células que conforman la región CA4 hipocampal clásica. También presenta otros tipos celulares minoritarios localizados principalmente cerca del *stratum granulosum*.

2.2.2. Hipocampo.

Las regiones CA del hipocampo propiamente dicho tienen una distribución en capas que de forma general tiene una organización parecida:

- *Alveus*: es la capa más profunda del hipocampo. Por él transcurren los axones mielinizados de las neuronas piramidales.
- *Stratum oriens*: formado por las dendritas basales de las células piramidales. Por él cursan axones de las células principales de CA3 (colaterales de Schaffer).
- *Stratum pyramidale*: formado por los somas de las células principales del hipocampo, las células piramidales. En esta capa se encuentran diversos tipos de interneuronas entre los que se encuentran las células en cesto.
- *Stratum lucidum*: esta estrecha capa acelular se encuentra exclusivamente a nivel de CA3. Representa la franja de fibras musgosas que proceden del giro dentado y anatómicamente delimita CA3 de CA2.
- *Stratum radiatum*: esta capa contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales y las colaterales de Schaffer de las células piramidales de CA3 que acaban en la parte proximal de las dendritas apicales de las células piramidales de CA1.
- *Stratum lacunosum-moleculare*: es la zona más superficial del hipocampo y contiene la parte distal de las dendritas apicales de las células piramidales. Es el lugar donde los axones de la vía perforante procedentes de la corteza entorrinal medial y el tracto temporo-ammónico contactan con las dendritas de las células piramidales.

2.3. Tipos celulares en la formación hipocampal.

Los tipos, características y conectividad de las células principales en el hipocampo y el giro dentado (Lopes da Silva y col., 1990), así como los de las interneuronas que con ellas se relacionan (Freund y Buzsaki, 1996) han sido estudiados tanto anatómicamente como electrofisiológicamente.

Las células principales de la formación hipocampal estarían formando el circuito trisináptico hipocampal cuya primera estación sería el giro dentado (células granulares y células musgosas) (Ribak y Shapiro, 2007), la segunda la región CA3 (células piramidales de CA3) (Traub y col., 1989) y la última la región CA1 (células piramidales de CA1) (Harris y col., 2001).

- **Células granulares:** son las células principales de la *fascia dentata*. Están densamente empaquetadas en el *stratum granulosum* y tienen un soma pequeño con dos árboles dendríticos dirigidos hacia el *stratum moleculare*. Los axones de las células granulares surgen del polo del soma opuesto a los árboles dendríticos y se denominan fibras musgosas. Conectan con las dendritas proximales de las células piramidales de CA3 formando los característicos terminales musgosos, concentrados en el *stratum lucidum* de CA3. Utilizan el glutamato como neurotransmisor.
- **Células musgosas:** son las células “principales” de la capa polimórfica del giro dentado. Lorente de No acuñó la terminología CA4 confundiéndolas con neuronas piramidales desplazadas. De hecho comparten características electrofisiológicas y neuroquímicas con las células piramidales de CA3. Se caracterizan por tener una elevada densidad de espinas dendríticas así como excrecencias espinosas en el soma y en el tramo proximal del árbol dendrítico. Sus proyecciones se circunscriben al *hilus* sin invadir CA3. Estas células son de naturaleza excitatoria (glutamatérgicas).
- **Neuronas piramidales CA3/CA2:** comparten, en cierta medida, las características morfológicas de las neuronas piramidales de CA1 aunque presentan cuerpos celulares un poco más grandes. Los axones de las neuronas de piramidales de CA3 envían colaterales hacia la región CA1 (colaterales de Schaffer). Usan el glutamato como neurotransmisor.

- **Neuronas piramidales CA1:** estas células presentan un gran árbol dendrítico apical a nivel del *stratum radiatum*, donde contactan las colaterales de Schaffer de las neuronas piramidales de CA3, y un árbol dendrítico basal extendido en el *stratum oriens* que en ocasiones alcanza el *alveus*. Algunas de las ramas del árbol dendrítico apical inervarían el *stratum lacunosum-moleculare* llegando incluso a la fisura hipocampal. De igual forma que las neuronas piramidales de CA3 liberan glutamato.
- **Interneuronas:** se distribuyen por todas las capas y regiones del hipocampo y se consideran neuronas inhibitoras de circuito local o interneuronas puesto que en su mayoría presentan inmunorreactividad para GABA. Dependiendo del criterio utilizado se han clasificado estas interneuronas en diversas categorías, llegando a solaparse los diferentes subgrupos, lo que indica la compleja heterogeneidad de esta población celular. Siguiendo criterios anatómicos y morfológicos las interneuronas de la formación hipocampal se podrían separar en células candelabro o células axo-axónicas, células en cesto, interneuronas que inervan las dendritas de las células principales e interneuronas especializadas en inervar a otras interneuronas. De otra forma, si seguimos como criterio clasificador el contenido en proteínas secuestradoras de calcio podemos dividir la población de interneuronas en parvalbúmina, calbindina D28k o calreitina positivas. Otro criterio de clasificación puede ser el del neuropéptido que colocaliza con el neurotransmisor principal (GABA), pudiendo encontrar interneuronas que contienen somatostatina, neuropéptido Y, colecistoquinina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), encefalina o neuroquinina entre otros. Para una revisión exhaustiva ver Freund y Buzsaki, 1996.

En el presente trabajo se han realizado cultivos primarios de esta estructura, por lo que hay que tener en cuenta que las características citoarquitectónicas y morfológicas se han perdido. Es por ello por lo que en adelante, el criterio de clasificación de los distintos subtipos celulares será por el principal neurotransmisor sintetizado y liberado. Es decir, nos referiremos a las células principales como células glutamatérgicas y a las interneuronas como células GABAérgicas.

3. IMPLICACIÓN DE LA TRANSMISIÓN COLINÉRGICA EN LA FUNCIONALIDAD DEL HIPOCAMPO

El sistema colinérgico consta de tres vías principales que modulan de forma difusa la actividad cortical: el primero de ellos está localizado en el núcleo pedunculopontino tegmental y el núcleo laterodorsal tegmental, enviando sus eferencias hacia el tálamo dorsal (Sherman, 2001), la *substantia nigra* (Everitt y Robbins, 1997) y sobre diversas estructuras corticales; el segundo se localiza en diversos núcleos del prosencéfalo basal (neuronas colinérgicas de la *substantia innominata*, de la banda diagonal de Broca y del núcleo basal magnocelular) y proyecta sus fibras principalmente al neocortex, a la corteza cingulada y a la amígdala (Semba, 2000); por último, el sistema que a nosotros más nos interesa se localiza también a nivel de los núcleos del prosencéfalo basal, pero sólo incluye a las células colinérgicas de proyección del área del septum medial, que proporcionan la principal aferencia colinérgica del hipocampo.

Entre las principales funciones moduladoras del sistema colinérgico, en las que está implicada la proyección septo hipocampal, se encuentran la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria, la atención, el refuerzo, el procesamiento sensorial, la activación límbica, ciertos fenómenos de plasticidad y el control de los patrones electroencefalográficos incluido el ciclo sueño/vigilia (Everitt y Robbins, 1997; Dimyan y Weinberger, 1999; Hasselmo, 1999; Detari, 2000; Manns y col., 2000; Rasmusson, 2000; Sarter y Bruno, 2000; Szymusiak y col., 2000; Sarter y Bruno, 2002).

La ACh está afectando a innumerables procesos desde a un nivel local, modulando la respuesta específica de una sola célula, hasta a un nivel asociativo superior en procesos tan complejos como la cognición, el aprendizaje o la memoria. En este apartado nos limitaremos a mencionar los más destacados y a proporcionar las herramientas bibliográficas adecuadas para un estudio más exhaustivo.

3.1. Acetilcolina y plasticidad neuronal.

La ACh juega un papel principal en los fenómenos cognitivos. Quizás el mejor ejemplo para la evaluación de los efectos de la ACh es la enfermedad de Alzheimer, donde los déficits de atención, aprendizaje y memoria están acompañados de una reducción de las proyecciones colinérgicas y de los AChRs tanto a nivel cortical como en

el hipocampo (Bartus y col., 1982). A altas dosis, fármacos como la escopolamina, que bloquean los mAChRs, causan un completo deterioro de las funciones cognitivas manifestándose como *delirium* (Ostfeld y Aruguete, 1962; Crow y Grove-White, 1973), mientras que a bajas dosis mejoran los resultados obtenidos en pruebas cognitivas, de memoria funcional y atención (Beatty y col., 1986). Estas observaciones generaron las bases de la hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer (Drachman y Leavitt, 1974). De hecho, la mayoría de los tratamientos hasta el día de hoy para la enfermedad de Alzheimer están basados en la restauración de la transmisión colinérgica mediante la inhibición de su enzima de degradación, la acetilcolinesterasa (Lane y col., 2006).

Muchos de estos efectos se han corroborado en numerosos estudios de agonistas y antagonistas colinérgicos, así como por lesiones específicas lo que sugiere una indudable implicación del sistema colinérgico en la cognición (Izquierdo, 1989; LeBlanc y col., 1999).

La activación de los nAChRs por nicotina, el componente neuroactivo del tabaco, potencia ciertas formas de memoria (Rezvani y Levin, 2001). La expresión de estos receptores tanto a nivel presináptico como postsináptico posibilita un gran control modulador en las regiones cerebrales implicadas en el aprendizaje y en los procesos de generación de memoria. En hipocampo, la nicotina facilita la potenciación a largo plazo (LTP) y convierte la potenciación a corto plazo (STP) en LTP (Fujii y col., 1999; McGehee, 2002; Mann y Greenfield, 2003; Nashmi y col., 2007). Por otro lado, la activación de los nAChRs por nicotina es capaz de recuperar los déficits en la memoria de trabajo inducidos por una destrucción de las proyecciones colinérgicas hipocampales (Grigoryan y col., 1994). Además, al ser canales ionotrópicos (Miyazawa y col., 2003) tienen la capacidad de inducir cambios rápidos en la excitabilidad de las células principales y de las diferentes poblaciones de interneuronas (Jones y Yakel, 1997; Frazier y col., 1998b; McQuiston y Madison, 1999b) y por su permeabilidad a Ca^{2+} pueden potencialmente influir en los procesos de aprendizaje y memoria a través de la activación de segundos mensajeros implicados en la plasticidad sináptica (Wonnacott, 1997; Vizi y Lendvai, 1999; Engelman y MacDermott, 2004). Es de destacar que puesto que la expresión de estos nAChRs es mayor en las interneuronas hipocampales que en las células piramidales la incidencia en la modulación de la actividad sináptica es mayor en la actividad inhibitoria (Jones y Yakel, 1997; McQuiston y Madison, 1999b).

La funcionalidad de los mAChRs, así como la de los sistemas de segundos mensajeros desencadenados por ellos, está implicada en la enfermedad de Alzheimer (Pavia y col., 1998): (i) algunos trabajos revelan una disminución significativa en los receptores hipocampales M2 (Flynn y col., 1995) o M4 (Mulugeta y col., 2003); (ii) el bloqueo de los mAChRs o lesiones de las proyecciones colinérgicas septohipocampales producen déficits de memoria y atención (Bartus y col., 1982; Callahan y col., 1993) y (iii) los fármacos que antagonizan los mAChRs perjudican los procesos de aprendizaje y memoria en roedores (Sutherland y col., 1982), mientras que los fármacos que activan estos mAChRs parecen ser útiles para mejorar los déficits cognitivos de la enfermedad de Alzheimer (Whitehouse, 1993).

Existen numerosos estudios neurofisiológicos que demuestran que la ACh modula la plasticidad sináptica. Un ejemplo lo encontramos en la generación de LTP.

Está demostrado que la generación de LTP en rata por un estímulo tetánico en las sinapsis de las dendritas basales de la región CA1 es mayor cuando la estimulación coincide con periodos de movilidad comparándolo con la LTP generada en una situación de inmovilidad (Leung y col., 2003). Este efecto se vio bloqueado por la aplicación de escopolamina y por la lesión de las proyecciones septohipocampales mediante el uso de una inmunoglobulina G unida a saporina. Esto sugiere que el aumento de la LTP durante la movilidad del animal está inducida por la liberación de ACh que ocurre durante la deambulación (Marrosu y col., 1995; Ovsepian y col., 2004).

Estudios *in vitro* con agonistas colinérgicos reflejan resultados similares a los anteriormente expuestos disminuyendo el umbral de generación de LTP en la región CA1 del hipocampo (Blitzer y col., 1990; Huerta y Lisman, 1993; 1995; Adams y col., 2004).

En general, debido al amplio rango de subtipos de receptores tanto nicotínicos como muscarínicos, así como por su localización pre y postsináptica otorgan al sistema colinérgico las características oportunas para ser el sistema ideal encargado de la plasticidad sináptica (Lanzafame y col., 2003; Miyazawa y col., 2003). Sin embargo, la mayoría de las acciones del sistema colinérgico sobre los procesos de aprendizaje y memoria y por tanto sobre la plasticidad, parecen estar regulados por la acción de los mAChRs, aunque hay algunas evidencias de una modulación adicional de los nAChRs. Además, los AChRs no sólo están presentes en las células principales sino que aparecen también en las interneuronas inhibitorias, lo que permite al sistema un nivel adicional a la hora de modular la excitabilidad hipocampal.

3.2. Función de la ACh en la generación de ritmos.

La señal colinérgica está íntimamente ligada a la generación de ritmos en el sistema nervioso central. Las oscilaciones de las redes neuronales proveen de un contexto temporal sobre el que el disparo de un potencial de acción de una neurona codifica cierta información, y por ende, las oscilaciones hipocámpales tienen una importancia vital en el aprendizaje asociativo y en los procesos de generación de memoria (O'Keefe y Recce, 1993; Buzsaki, 2002).

La mayoría de las investigaciones que estudian estos mecanismos están realizadas *in vitro*, puesto que se ha avanzado mucho más en los últimos años en la accesibilidad experimental a la generación de ritmos en rodajas de tejido cerebral comparado con los avances en los estudios *in vivo*.

La activación de los AChRs puede generar sincronía en la excitabilidad neuronal que da lugar a diferentes estados oscilatorios, dependiendo de la concentración de agonista y del subtipo de receptor activado. Entre estos estados sincrónicos podemos destacar las oscilaciones en frecuencia *theta* (4-8 Hz), *beta* (12- 30 Hz) y *gamma* (30-90 Hz) (Fisahn y col., 1998; Shimono y col., 2000; Luo y col., 2008). Estos estados dependen tanto de la transmisión inhibitoria como de la excitadora y son anulados tanto si se interrumpe la señalización GABAérgica como glutamatérgica.

El ritmo *theta* está modulado tanto por las entradas colinérgicas como GABAérgicas en el sistema desde la vía del septum medial (Stewart y Fox, 1990; Vertes y Kocsis, 1997; Buzsaki, 2002) y está asociado a incrementos en los niveles de ACh (Monmaur y col., 1997; Zhang y col., 2010). En roedores aparece cuando inician el comportamiento de exploración y durante el sueño REM (Buzsaki, 2002; Brankack y col., 2009). Estas oscilaciones permiten la transición entre los procesos de codificación y recuperación en la generación de memoria (Winson, 1978; Hasselmo y col., 2002). La aplicación de agonistas muscarínicos a una rodaja de hipocampo genera oscilaciones en la frecuencia *theta* que estarían implicadas en la modulación de la inducción de LTP (MacVicar y Tse, 1989; Huerta y Lisman, 1995; Traub y col., 2004).

En cuanto al ritmo *gamma* se observa en numerosas áreas cerebrales tanto en estados de sueño como en vigilia y está inexorablemente unido a la inhibición perisomática. La habilidad de ciertos tipos neuronales para sincronizar el disparo de

potenciales de acción con precisión de milisegundos depende de rápidas fluctuaciones del potencial de membrana.

Son numerosas las revisiones que discuten los procesos biológicos en los que están implicados los ritmos a frecuencias entre 30 y 90 Hz (Gray, 1994; Whittington y col., 2000; Laurent, 2002; Traub y col., 2002; Bartos y col., 2007; Tiesinga y Sejnowski, 2009; Wang, 2010), así como su papel en procesos cognitivos (Singer y Gray, 1995; Engel y col., 2001; Varela y col., 2001; Fries, 2005; 2009; Wang, 2010) y en enfermedades (Llinas y col., 1999; Lewis y col., 2005; Uhlhaas y Singer, 2006).

Las oscilaciones en frecuencias *gamma* tienen unas cinéticas muy similares en una gran variedad de regiones cerebrales y en especies diferentes, pero su estudio han dado las claves para entender mejor sus requerimientos y mecanismos. Las oscilaciones *gamma* se han descrito y caracterizado en diversas áreas como el neocortex (Gray y col., 1989), corteza entorrinal (Chrobak y Buzsaki, 1998), amígdala (Halgren y col., 1977), estriado (Berke y col., 2004), tálamo (Pinault y Deschenes, 1992) e hipocampo (Buzsaki y col., 1983; Bragin y col., 1995; Whittington y col., 1995; Mann y col., 2005).

El compendio de estudios efectuados en este campo llega a la conclusión de que sólo hay tres requerimientos para la generación de una oscilación a frecuencia *gamma*: interneuronas inhibitoras conectadas entre sí, una constante de tiempo aportada por las características de los receptores GABA_A y suficiente impulso para inducir el disparo de las interneuronas (Whittington y col., 1995; Traub y col., 1996; Wang y Buzsaki, 1996). Este impulso puede estar generado mediante una activación sostenida de los receptores metabotrópicos para glutamato (Whittington y col., 1995), por receptores de kainato (Hajos y Paulsen, 2009) o por la activación de mAChRs (Fisahn y col., 1998).

OBJETIVOS

El sistema colinérgico está implicado en multitud de funciones moduladoras en el SNC. A nivel hipocampal está modulando la respuesta del sistema glutamatérgico por su interacción con las neuronas piramidales mientras que por las sinapsis que forma sobre las interneuronas también está modulando el sistema GABAérgico. El principal objetivo de este trabajo de investigación será:

- ✓ **determinar la implicación de la activación de los mAChRs en la modulación de la transmisión GABAérgica.**

Para ello utilizaremos como material biológico los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata y usaremos técnicas de *patch clamp*.

Para la consecución de este objetivo principal nos apoyaremos en objetivos parciales, más concretos, que nos servirán para ir resolviendo pequeñas cuestiones, cuyo análisis integral nos dará una visión general del problema que estamos dispuestos a resolver, con el fin de poder emitir unas conclusiones satisfactorias.

- 1) **Encontrar un abordaje metodológico que permita evaluar corrientes GABAérgicas aisladas.** Excluyendo los bloqueantes glutamatérgicos podremos evitar su posible interferencia con el correcto funcionamiento de la transmisión GABAérgica.
- 2) **Evaluar el efecto de la activación de los receptores muscarínicos a nivel de la transmisión GABAérgica y localizar la zona de actuación de metacolina a nivel sináptico.** Los fármacos que modulan la actividad sináptica pueden actuar a nivel presináptico o postsináptico. El estudio de las corrientes miniatura y de las I_{GABA} nos permitirán responder a esta pregunta.
- 3) **Averiguar que subtipos de mAChRs están implicados en la regulación del sistema GABAérgico.** Realizaremos un estudio farmacológico para estudiar los diferentes subtipos de mAChRs y su implicación en la regulación de la transmisión GABAérgica.

- 4) **Indagar en los mecanismos efectores implicados en la activación de los mAChRs.** Los mAChRs están unidos a proteínas G de diferentes subtipos que efectúan su acción por vías diferentes. El estudio de estas rutas ayudará a un mejor entendimiento de la actuación de metacolina.
- 5) **Determinar el efecto de metacolina sobre una sinapsis GABAérgica aislada.** Además de examinar el efecto de metacolina sobre la sumación de señales en una red neuronal nos planteamos trabajar también sobre una única sinapsis para comprender mejor su modo de actuación. Usaremos tanto autapsis como la técnica de estimulación de fibra aislada.
- 6) **Estudiar la acción de metacolina sobre los contingentes vesiculares y los canales de calcio dependientes de voltaje.** Aplicando distintos protocolos de estimulación valoraremos el papel de la activación de los receptores muscarínicos en la modulación de la probabilidad de liberación de neurotransmisor. Además el uso de toxinas específicas para los canales de calcio dependientes de voltaje nos permitirá conocer la especificidad del efecto de metacolina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE NEURONAS EMBRIONARIAS DE HIPOCAMPO DE RATA.

Todos los experimentos realizados en este trabajo de investigación se llevaron a cabo usando neuronas de hipocampo disecadas de embriones de rata con 18 días de gestación.

Para la realización de los cultivos primarios se siguieron estrictamente las normas para manipulación de animales establecidas por el Comité Ético Nacional para el manejo de animales de experimentación y por el Comité Local de protección de animales de la Universidad Autónoma de Madrid.

Los animales utilizados como modelo de investigación fueron ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley mantenidas en una habitación limpia de estabulación con comida y bebida *ad libitum*, y con un ciclo de luz de 12/12 horas. En estas condiciones se procedió al cruce de hembras en estado de estro (comprobado mediante frotis vaginal) con machos reproductores de la misma cepa. La determinación del primer día de gestación se realizó mediante la constatación de tapón vaginal. En el día 18 de gestación se sacrificaron las hembras gestantes por decapitación y se extrajeron los embriones mediante cesárea. El número de embriones por cesárea fue 12-18.

Una vez aislados los embriones de su saco vitelino, se decapitaron con la ayuda de unas tijeras de punta roma Schreiber (Fridingen, Alemania) y se extrajo el cerebro previa separación del hueso en formación del cráneo a partir de bregma. Todo este proceso se realizó en un tampón fosfato salino (PBS) frío (4°C y sobre hielo) con una composición (en mM): 137 NaCl; 2,7 KCl; 11,6 NaH₂PO₄; 1,47 KH₂PO₄, (pH 7,4 ajustado con NaOH). Posteriormente, con la ayuda de un estereomicroscopio Meiji Techno modelo EMZ-1 (Saitama, Japón) iluminado con una lámpara de luz fría Leica modelo CLS 150x (Wetzlar, Alemania), se separaron los dos hemisferios cerebrales por la cisura interhemisférica y se disecaron los hipocampos en medio PBS frío suplementado con 1mg/ml de albumina de suero bovino (BSA) y glucosa 10 mM.

Concluida la disección del tejido hipocampal se procedió a su digestión enzimática en PBS suplementado que contenía 0,5 mg/ml de papaína de *Papaya latex* y 0,25 mg/ml de deoxirribonucleasa I de páncreas bovino (DNAsa). Tras 20 minutos de digestión enzimática a 37°C, se reemplazó la disolución enzimática por medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, y sin piruvato,

suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y al que se había añadido con anterioridad 5 ml/l de una mezcla de penicilina/estreptomicina (10 000 unidades/ml, 10 000 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) y 1 ml/l de gentamicina (50 $\mu\text{g/ml}$). Teniendo los hipocampos digeridos enzimáticamente en este medio se realizó una digestión mecánica mediante una pipeta Pasteur de vidrio de 150 mm, Normax (Marinha Grande, Portugal), con la punta flameada para así reducir el daño celular. De esta forma conseguimos una suspensión celular completamente disgregada.

La suspensión celular resultante se centrifugó durante 4 minutos a 800 r.p.m. (120xg) en una centrífuga TQTECH modelo Unicen 20 (Albacete, España) y tras retirar el sobrenadante, se resuspendió en medio DMEM suplementado con FBS. Se contaron las células obtenidas ayudándonos de una cámara de Neubauer (0,0025 mm²) y se realizaron los cálculos oportunos para sembrar en placas Petri de 4 cm de diámetro (Vertex, Madrid, España), el número de células adecuado para cada situación experimental. Con este protocolo experimental se obtienen aproximadamente 4 millones de células por cesárea.

Las placas Petri habían sido preparadas, el día previo al cultivo, con poli-D-lisina (0,1 mg/ml) cubriendo completamente el fondo. Con este tratamiento conseguimos cambiar las cargas del sustrato de cultivo, facilitando así la adhesión celular, sin estimular la actividad biológica de las células. Aunque es un compuesto sintético y carece de las impurezas de los polímeros naturales, se procedió al lavado de las placas con agua estéril el día de cultivo, dejando que secasen por evaporación antes de sembrar las células. En el caso de los cultivos de autapsis las placas Petri fueron pretratadas con agarosa 0,15% el día anterior a la aplicación del sustrato. Se añadió colágeno 0,25 mg/ml a la disolución de poli-D-lisina y se difuminó ésta sobre el fondo de las placas Petri ayudándonos de un spray pulverizador con el fin de obtener microgotas del polímero. Estas placas no se lavaron previamente a la siembra pero se comprobó que estuvieran completamente secas.

Las diferentes densidades de siembra fueron:

- Cultivo de alta densidad: 100 000 células/ml; 2 ml por placa de Petri. A esta densidad se realizaron los experimentos de transmisión sináptica, disparo de potenciales de acción y estudios de corrientes iónicas aisladas.
- Cultivo de baja densidad: 60 000 células/ml; 2 ml por placa de Petri. A esta densidad de siembra se realizaron los experimentos de estimulación eléctrica de fibra aislada.

- Cultivo de autapsis: 20 000 células/ml; 400 µl por placa de Petri. Experimentos de autapsis glutamatérgicas y GABAérgicas.

Una vez sembradas, las células se mantuvieron en una estufa de cultivo Heal Force modelo HF151UV (Sanghai, China), en una atmósfera con un 5% de CO₂ a 37°C y saturada de humedad. Tras 24 horas en estas condiciones, tanto a los cultivos de alta densidad como a los de baja densidad, se les cambió el medio de cultivo. Se procedió al reemplazo del medio de cultivo DMEM suplementado con FBS por medio Neurobasal, suplementado con 60 mg/ml de L-glutamina, al que fueron añadidos, en las mismas concentraciones que para el medio DMEM, los antibióticos penicilina/estreptomicina y gentamicina. En esta situación el FBS fue sustituido por el suplemento B-27 (suplemento libre de suero para crecimiento y viabilidad de larga duración de neuronas de hipocampo). En el caso especial de los cultivos de autapsis este cambio se realizó a las 2 horas después del sembrado, añadiendo ya un volumen de 2 ml por placa. En estas condiciones, la supervivencia celular es de más de 21 días, tiempo suficiente para la realización de los experimentos y es necesario realizar un refresco del medio de cultivo de forma periódica. Para este proceso se retira parte del medio, eliminando los productos de desecho y renovando las condiciones de suplementos metabólicos y pH.

Los experimentos se realizaron en neuronas de 12-18 días *in vitro* que cumplieran los siguientes criterios (ver figura 13):

- 1) Adhesión al sustrato.
- 2) Diámetro del soma de 15-30 µm.
- 3) Presencia de extensiones dendríticas.
- 4) Ausencia de vacuolas intracelulares.
- 5) Cuerpos celulares birrefringentes, con los límites plasmalemales oscuros.

Es importante destacar que puesto que los cultivos de neuronas de hipocampo son de larga duración y son susceptibles de contaminación, el manejo de las células disgregadas y los cambios de medio realizados, se realizaron con material estéril y en el interior de una campana de flujo laminar horizontal Indelab modelo idl96h (Pamplona, España).

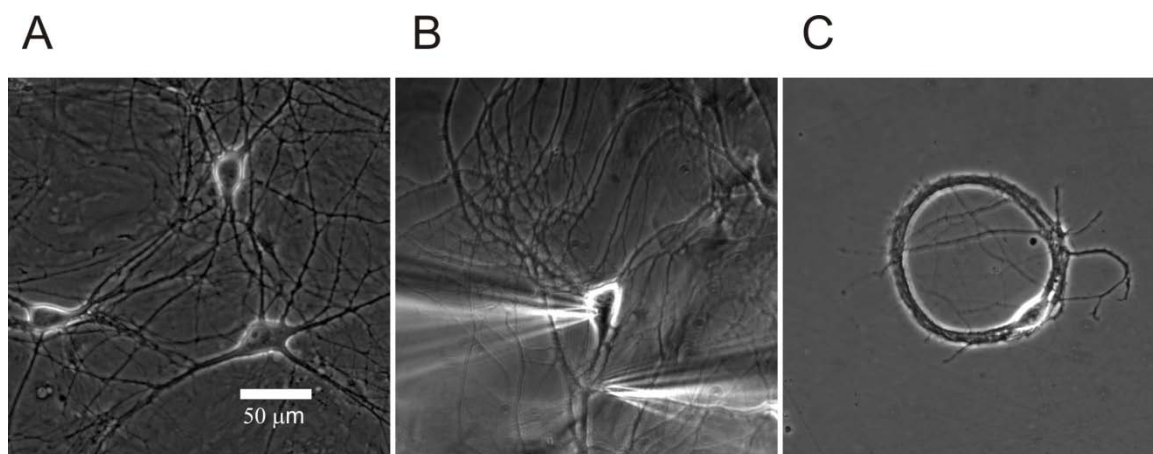


Figura 13. Micrografías de cultivos de neuronas embrionarias de hipocampo de rata. **A.** Cultivo de alta densidad. **B.** Cultivo de baja densidad. Podemos observar la disposición de las pipetas de *patch clamp*. La situada más arriba estaría formando el parche de membrana, mientras que la inferior estimularía una fibra aislada. **C.** Autopsia. Destacar la total ausencia de conexiones de células adyacentes. La edad de estas células en cultivo es de 16 días y ejemplificaría los criterios de selección estipulados.

2. TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS.

2.1. El *patch clamp*.

Desde que Luigi Galvani, a finales del siglo XVIII, demostrase la propagación del potencial de acción y desarrollase la teoría de la excitación eléctrica (Galvani, 1791; Piccolino, 1998), pasando por el desarrollo de electrodos intracelulares para la fijación de voltaje empleados por Alan Hodgkin y Andrew Huxley a mediados del siglo XX, para introducir la teoría iónica para la excitación de membranas (Hodgkin y Huxley, 1939), el mayor avance en cuanto al conocimiento de la comunicación entre células excitables ha sido el desarrollo, a finales del siglo XX, de la técnica de *patch clamp* por Erwin Neher y Bert Sakmann (Hamill y col., 1981).

La capacidad de esta técnica de disminuir el ruido eléctrico de fondo de las preparaciones biológicas, permitió el estudio directo del flujo de corriente a través de un solo canal iónico, dando paso a la electrofisiología moderna que permite el estudio de los mecanismos de transducción de las señales eléctricas.

La técnica de *patch clamp* se fundamenta en la característica de las células vivas de tener una diferencia de potencial (V_m) entre ambos lados de la membrana plasmática. Esta asimetría en cargas iónicas entre el interior celular y el medio que la rodea se debe principalmente a la función de las bombas iónicas insertadas en la membrana y a las

características de impermeabilidad a iones de la misma. En sí misma, la técnica de *patch clamp* es una variación de la técnica de fijación de voltaje y consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un pequeño parche de membrana. De este modo, si en respuesta a un determinado estímulo se produce un trasiego de cargas a través de los diferentes canales y/o receptores presentes en el parche de membrana, la corriente que es necesario inyectar para mantener el V_m fijado sería equivalente al movimiento de cargas a través del parche de membrana.

Apoyándonos en el desarrollo matemático del físico alemán Georg Ohm podemos explicar mejor los dos tipos de modalidades de la técnica de *patch clamp*. La referida ley de Ohm describe la relación:

$$I = V / R$$

donde I es la intensidad de la corriente medida en amperios (A); V es el voltaje medido en voltios (V) y R es la resistencia medida en ohmios (Ω). Específicamente y puesto que en la técnica de *patch clamp* la resistencia es constante, la modalidad de fijación de voltaje permite la medida de corrientes a través de la membrana y la modalidad de fijación de corriente permite la medida del trasiego de voltaje.

La ventaja de esta técnica, frente a la de fijación de voltaje, es el uso de un único electrodo que simultanea, a alta frecuencia, la medida del potencial de membrana con la inyección de corriente necesaria para mantenerlo fijado, lo que posibilita acceder a células de un tamaño considerablemente menor que el permitido para las técnicas clásicas y discriminar corrientes microscópicas del orden de pA.

El procedimiento para el correcto funcionamiento de esta técnica es la formación de un sello de alta resistencia entre el electrodo de registro y la membrana celular. Se utilizan pipetas estiradas al fuego, rellenas de una solución específica, en cuyo interior se encuentra el electrodo de registro (con una resistencia eléctrica de entre 2-5 M Ω). Se acerca a la membrana de la célula ejerciendo una pequeña presión que hace aumentar la resistencia del orden de 10 veces. A continuación se aplica una pequeña succión con el fin de aumentar la resistencia del sello hasta alcanzar los 10-100 G Ω . Estos sellos son conocidos como gigasellos, que reducen el ruido y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño, permitiendo únicamente que las corrientes originadas en el parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medición de corriente, que se cierra con la presencia de un electrodo de referencia que está en contacto con el líquido extracelular. De este modo se consigue fijar el potencial de membrana en el

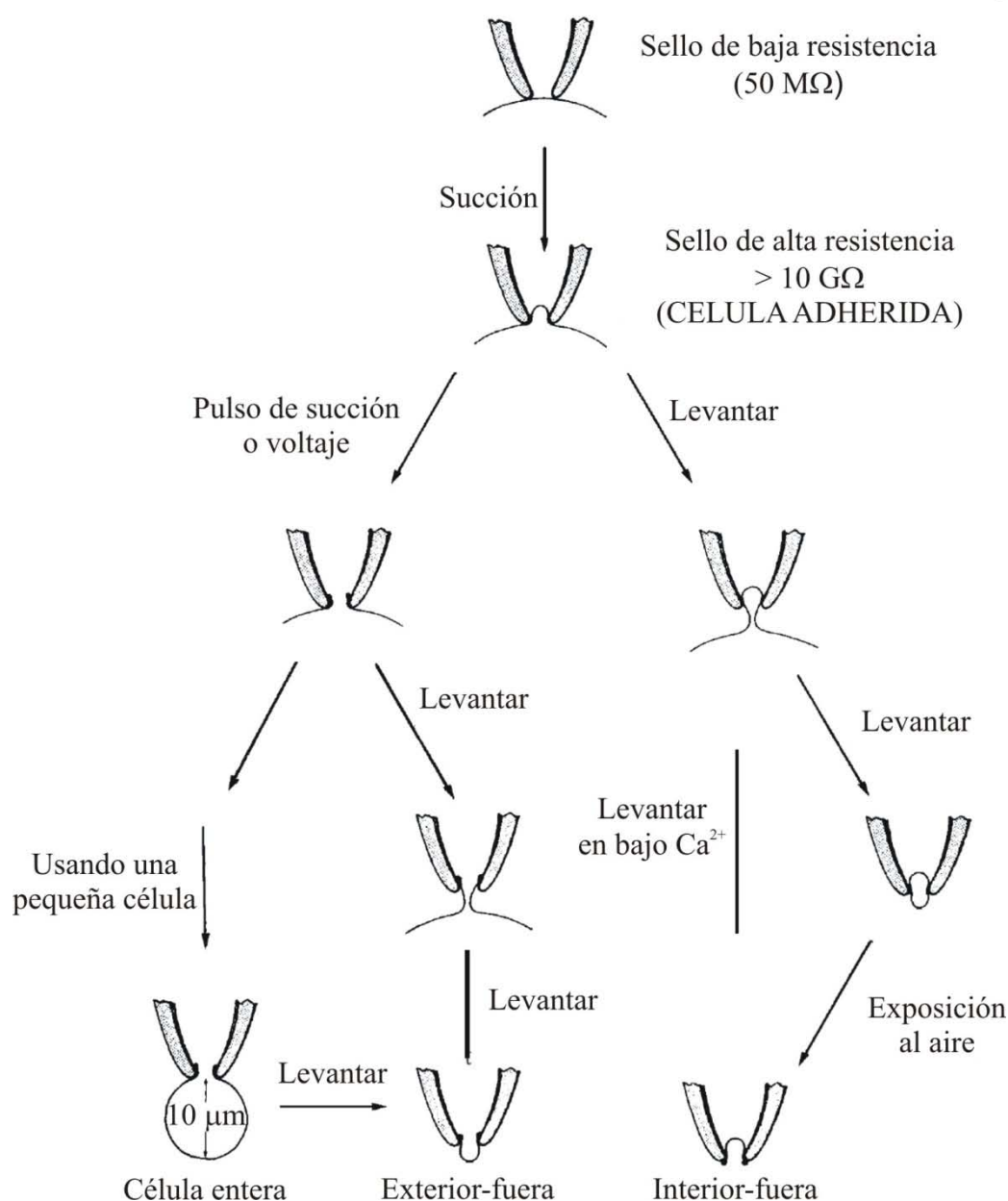


Figura 14. Representación esquemática de los procedimientos que conducen a las configuraciones de registro. Las cuatro configuraciones de registro son: célula adherida, registro de célula entera, parche exterior-fuera y parche interior-fuera. Modificada de Hamill et al., 1981.

parche de membrana, consiguiéndose así la configuración base de la técnica de *patch clamp*, la célula adherida.

La particularidad de los gigasellos conseguidos con esta técnica es que son muy estables desde un punto de vista mecánico. Esta peculiaridad permite la manipulación de los mismos y por tanto la obtención de las diferentes configuraciones que esta técnica admite: parche *in situ* o célula adherida, célula entera, parche escindido exterior-fuera y parche escindido interior-fuera (ver figura 14).

En la elaboración de los experimentos de esta tesis, la configuración de la técnica de *patch clamp* usada ha sido la de célula entera y una modificación de la misma que se denomina parche perforado (Horn y Marty, 1988).

Para la consecución de la configuración de célula entera se parte de la anteriormente mencionada configuración de célula adherida. Si se aplica una pequeña succión o presión negativa en el interior de la pipeta se puede producir la ruptura del parche de membrana que hay bajo los bordes de la pipeta, produciéndose la comunicación del ambiente intracelular con el contenido de la pipeta. Al ser el contenido de la pipeta un volumen muchísimo mayor que el citoplasma, permite al investigador controlar la composición iónica tanto del exterior celular (líquido de perfusión), como la del interior, por lo que se pueden diseñar los protocolos específicos para la lectura de actividad del sistema deseado. Pero este control es a su vez la principal limitación de esta configuración, puesto que se produce un lavado de componentes intracelulares, que puede conllevar un lavado de la señal obtenida o una pérdida de componentes moduladores y segundos mensajeros.

Para evitar este inconveniente existe una variación de la configuración de célula entera que se denomina “parche perforado” (Horn y Marty, 1988). Esta modalidad permite, al igual que en la configuración de célula entera, registrar la corriente de todos los canales presentes en la membrana plasmática, pero evita el lavado de componentes citoplasmáticos, por lo que se puede realizar estudios de modulación postsináptica por segundos mensajeros. Para conseguir esta configuración es necesario añadir en el líquido de la pipeta un antifúngico (anfotericina B, gramicidina, nistatina), llegar a la situación de célula adherida y esperar que el antifúngico forme poros en la membrana, permeables a iones monovalentes e impermeables a iones multivalentes y a moléculas no electrolíticas, que permitan el acceso eléctrico. Esta modalidad posibilita obtener sellos mucho más estables que permiten registrar durante mucho más tiempo, pero no permite el control de la composición del lado intracelular del circuito.

2.2. Registros electrofisiológicos utilizados en esta tesis.

Todos los registros realizados en modo fijación de voltaje en esta tesis se han realizado en la configuración de célula completa, mientras que los registros en modo fijación de corriente se han realizado en la variante “parche perforado”.

El soporte donde se realizaron todos los experimentos fue la propia placa de cultivo, donde se reemplazó el medio de cultivo por la disolución extracelular adecuada para cada grupo de experimentos (ver en detalle a continuación). Ésta encajaba perfectamente sobre un anillo metálico situado en la plataforma de un microscopio invertido Nikon Eclipse T2000, que presentaba un revolver con 3 objetivos Nikon intercambiables 10x, 20x y 40x. Los experimentos se realizaron a una temperatura de 22-24°C y el intercambio de soluciones experimentales se realizó mediante la aproximación de una pipeta de fabricación artesanal a la célula sometida a estudio. En esta pipeta confluían 5 vías de perfusión reguladas por gravedad e intercambiadas por un sistema de electroválvulas solenoides excluyentes (The Lee Company, Westbrook, CT, USA) operadas manualmente a través de un controlador (Segainvex, Madrid, España). La distancia sobre la célula a estudio fue aproximadamente de 100 μm y la velocidad aproximada de flujo fue de 1 ml/min, estimándose el total recambio de disoluciones experimentales en 50 ms.

Por otro lado, la pipeta de *patch* se montó sobre el cabezal de un preamplificador de *patch clamp* EPC-10 (HEKA Electronic, Lambrecht, Alemania). Esta pipeta se fabricó a partir de capilares de borosilicato, modelo Kilmax-51 (Kimble Kontes, México). Con la ayuda de un estirador vertical Narishige, modelo PC-10 (Tokio, Japón), se afilaron los capilares en dos pasos, puliéndose posteriormente la punta con ayuda de una microforja Narishige, modelo MF-830 (Tokio, Japón). Con este protocolo conseguimos que la punta de los capilares tenga un diámetro aproximado de una micra (1 μm). Una vez rellenos de la disolución intracelular adecuada para cada grupo experimental (véase en detalle a continuación), estos capilares o pipetas alcanzaron una resistencia entre 3-4 M Ω .

El posicionamiento del sistema de perfusión así como el de la pipeta de registro se controlaron mediante el uso de micromanipuladores hidráulicos Narishige (Tokio, Japón).

En cuanto al sistema de estimulación celular y de adquisición de datos se utilizó para los registros de transmisión sináptica y potenciales de acción y el estudio de corrientes iónicas el software de HEKA Elektronik PULSE (HEKA Electronic, Lambrecht, Alemania). En el caso de los experimentos realizados en autapsis y corrientes postsinápticas provocadas se utilizó el software de registro HEKA Elektronik MasterPulse (HEKA Electronic, Lambrecht, Alemania).

Ambos programas de HEKA Elektronik permiten cancelar los transientes capacitativos y compensar electrónicamente la resistencia en serie. Los datos

experimentales se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y se filtraron a 1-2 kHz. Los registros con una corriente de fuga superior a 50 pA o con una resistencia de acceso superior a 20 MΩ fueron descartados.

Para provocar la señal presináptica empleada en los registros de corrientes postsinápticas se usó un estimulador de pulsos aislados A-M System modelo 2100 (Calsburg, WA, USA). Este estimulador transmitía la señal a través de una pipeta rellena de una disolución Tyrode estándar (ver abajo) que se controlaba mediante un sistema de micromanipulación asistida Eppendorf modelo PatchManTM NP2 (Milán, Italia). La pipeta de estimulación se situó sobre una fibra de una interneurona GABAérgica en una configuración de “loose seal” (ver (Baldelli y col., 2002) para más detalles). Se aplicó una corriente de una duración de 0,1 ms con una intensidad de entre 5-25 μA para provocar una respuesta monosináptica con una latencia inferior a los 4 ms. Latencias en la respuesta superiores a este tiempo fueron descartadas en este estudio; además se comprobó que se estaba estimulando una única fibra presináptica separando unos pocos micrómetros la pipeta, lo que conllevaba la desaparición de la señal. En caso contrario se descartaba la fibra presináptica. La intensidad de la señal se mantuvo 1,5 veces el umbral de estimulación, a pesar de que las señales se mantienen estables incluso aplicando el doble de la intensidad umbral durante el experimento.

En este grupo de experimentos, al igual que en los experimentos realizados en autapsis, en el registro de corrientes miniatura o en el estudio de corrientes iónicas, se fijó el potencial de membrana a -70 mV y se aplicaron diferentes protocolos de estimulación explicados en la sección IV. En el caso de los experimentos de transmisión sináptica el potencial de membrana fijado fue 0 mV (más detallado en esta sección), dejando el potencial de membrana libre en el caso de los experimentos realizados en modo fijación de corriente (estudio de potenciales de acción).

3. DISOLUCIONES.

3.1. Disoluciones extracelulares empleadas en los diseños experimentales.

La disolución base (Tyrode) de los diseños experimentales fue la siguiente (en mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 10 ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina etano sulfónico (HEPES), 10 glucosa y 2 CaCl₂ ajustado a un pH de 7,4 con NaOH.

A esta disolución se le aplicaron diversas modificaciones dependiendo del diseño experimental sujeto a estudio pero compartiendo la misma base química.

En el caso del estudio de las corrientes de Ca^{2+} inducidas por la aplicación de un pulso de corriente, la concentración de Ca^{2+} usada fue 10 mM. El fin de este aumento de la concentración extracelular de Ca^{2+} fue producir un aumento considerable de la señal que permite una mejor evaluación del efecto farmacológico.

Para el estudio de corrientes miniatura, tanto a potenciales de fijación de voltaje de -70 mV como de 0 mV, así como para el estudio de corrientes de Ca^{2+} voltaje dependientes se añadió tetrodotoxina (TTX), (Tocris, Bristol, Inglaterra) a una concentración de 1 μM . Esta toxina, procedente del hígado del pez globo (*Takifugu sp.*) bloquea los canales de Na^+ inhibiendo la propagación de potenciales de acción y permitiendo el estudio de la liberación estocástica de neurotransmisor.

En los experimentos de estimulación eléctrica de una fibra presináptica, para el posterior estudio de corrientes postsinápticas provocadas, se añadió a la disolución Tyrode estándar 10 μM de 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) y 50 μM de ácido D(-)-2-amino-5 fosfonoaléico (D-AP5) para bloquear la transmisión glutamatérgica mediada por receptores AMPA y NMDA respectivamente.

3.2. Disoluciones intracelulares empleadas en la elaboración de los experimentos.

La técnica de *patch clamp* permite al investigador controlar la composición iónica del interior celular. Se han utilizado distintas disoluciones intracelulares en la evaluación de ciertos grupos experimentales que a continuación se detallan.

En todos los registros realizados en autapsis se utilizó una disolución intracelular cuya composición fue (en mM): 160 KCl, 10 ácido 5 etilen glicol-bis (2 aminoetileter) N, N, N', N' tetraacético (EGTA), 5 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP y 10 HEPES. El pH se ajustó a 7,3 con KOH.

La disolución interna utilizada tanto para el registro de potenciales miniatura con el potencial de membrana fijado a -70 mV, como en el estudio de las corrientes postsinápticas provocadas contenía (en mM): 100 Cs-metanosulfonato, 20 CsCl, 2 MgCl_2 , 5 EGTA, 4 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, 15 fosfocreatina, 10 N-etil bromuro de lidocaína (QX-314), 10 HEPES con un pH de 7,3 ajustado con CsOH.

En el grupo de experimentos diseñados para el estudio de las corrientes de Ca^{2+} las células fueron dializadas con una disolución intracelular de composición (en mM): 10 NaCl, 100 CsCl, 20 cloruro de tetraetilamonio (TEA·Cl), 5 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, 14 EGTA, 20 HEPES y pH 7,3 ajustado con CsOH.

La composición de la disolución intracelular en el estudio de potenciales de acción mediante la configuración de parche perforado fue (en mM): 135 KCl, 10 NaCl, 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 5 EGTA ajustando el pH con KOH a 7,3. El agente permeabilizante usado fue la anfotericina B en una concentración de 50-100 $\mu\text{g/ml}$ (Rae y col., 1991). La anfotericina B fue disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 50 mg/ml y almacenada en pequeñas alícuotas a -20°C . La concentración final de DMSO no sobrepasaba el 1%. Esta disolución intracelular se preparaba nueva cada dos horas para asegurarnos del perfecto funcionamiento del antifúngico, además para facilitar el sello se tomaba la precaución de sumergir la punta de la pipeta en solución fresca sin anfotericina antes de proceder al rellenado con la disolución con anfotericina. Los registros efectuados en esta configuración comenzaron cuando la resistencia de acceso al interior celular fue menor de $15\text{ M}\Omega$, lo cual suele ocurrir tras 10-15 minutos de haber efectuado el gigasello.

El resto de experimentos de transmisión sináptica se efectuaron con una disolución intracelular carente de iones cloruro. La composición de la misma se detallará y justificará a continuación.

4. METODOLOGÍA.

4.1. Fijación de voltaje a 0 mV.

Históricamente en nuestro laboratorio, se han estudiado los mecanismos subyacentes a la neurotransmisión fijando el voltaje celular por debajo del potencial libre en reposo del tipo celular a estudio. En el caso concreto del estudio de la transmisión sináptica en células de hipocampo de rata en cultivo, los trabajos realizados por nuestro grupo de investigación se realizaron fijando el voltaje de estas células a -80 mV .

Con este procedimiento se registraban simultáneamente corrientes postsinápticas de naturaleza glutamatérgica o excitadora (EPSCs) o de naturaleza GABAérgica o inhibitoras (IPSCs). El método para el estudio individual de cada una de ellas se apoyaba

en la farmacología, es decir, se usaban distintos antagonistas de los receptores de neurotransmisores para aislar las corrientes de interés.

En el caso concreto de los objetivos de esta tesis, para el estudio de las IPSCs se deberían añadir a la disolución extracelular bloqueantes de los receptores glutamatérgicos que impedirían el registro de EPSCs. Pero el uso de estos antagonistas bloquearía la transmisión excitadora espontánea, por lo que la actividad inhibidora espontánea se vería fuertemente reducida. Además, está documentado que el uso de antagonistas GABAérgicos y glutamatérgicos puede interferir postsinápticamente sobre ciertos receptores colinérgicos (Arnaiz-Cot y col., 2008).

Para afrontar este problema metodológico y basándonos en la literatura (Barker y Harrison, 1988; Alkondon y col., 1999) decidimos fijar el V_m de la célula a estudio a 0 mV. Bajo estas condiciones sólo se registran corrientes GABAérgicas de salida puesto que 0 mV es un valor cercano al potencial de reversión de las corrientes glutamatérgicas.

Para aislar las corrientes GABAérgicas en las mejores condiciones para su estudio nos valimos de tres disoluciones intracelulares que definimos según la concentración del anión cloruro (Cl^-) y que evaluamos por la rápida aplicación exógena de una concentración de 100 μ M de ácido γ -aminobutírico (GABA). La aplicación durante 500 ms de este agonista de los receptores GABA_A generaba una corriente de cloruro (I_{GABA}), cuya amplitud variaba según el potencial de membrana fijado en la célula y la concentración de Cl^- intracelular a estudio (ver figura 15).

En este grupo de experimentos las células fueron superfundidas con una solución estándar Tyrode, anteriormente descrita, con una concentración de Cl^- de 150 mM y se evaluó el tamaño de las corrientes GABAérgicas a diferentes V_m desde -100 a +40 mV.

La composición de las disoluciones intracelulares fue la siguiente (en mM):

- 0 mM de Cl^- : 160 Cs-metanosulfonato, 10 EGTA, 5 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, 10 HEPES ajustado a pH 7,3 con CsOH.
- 12 mM de Cl^- : 8 NaCl, 135 Cs-metanosulfonato, 2 $MgCl_2$, 5 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, 14 EGTA, 20 HEPES; pH ajustado con CsOH a 7,3.
- 130 mM de Cl^- : 10 NaCl, 100 CsCl, 20 (TEA-Cl), 5 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, 20 HEPES, pH 7,3 ajustado con CsOH.

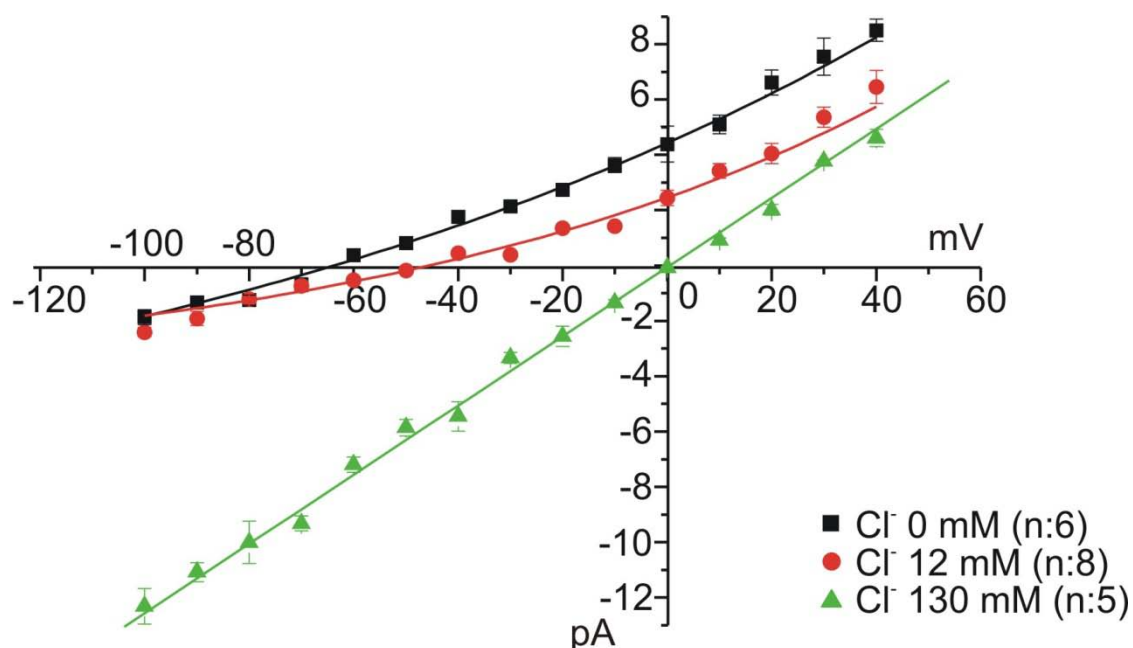


Figura 15. Respuesta a GABA de las neuronas de hipocampo en cultivo. Los símbolos representan la corriente de respuesta producida por la aplicación de 100 μM de GABA a varios potenciales de membrana y usando diferentes disoluciones intracelulares. Los cuadrados negros representan la respuesta de 6 células dializadas con una disolución basada en metanosulfonato (0 mM de Cl^-). Los círculos rojos y los triángulos verdes representan la corriente inducida por GABA en 8 y 5 células respectivamente en las que se utilizó una disolución intracelular con 12 ó 130 mM de Cl^- . La I_{GABA} correspondiente a la disolución intracelular con 130 mM de Cl^- se ajustó a una línea recta, mientras que las otras dos se ajustaron a una función exponencial de primer orden (valores de R^2 : 0,990, 0,975 y 0,998 para los grupos experimentales con 0, 12 y 130 mM de Cl^- intracelular respectivamente). Datos representados como valor medio \pm E.S.M.

La aplicación de GABA produjo corrientes de Cl^- de entrada o salida dependiendo del V_m fijado en la célula. Así, el potencial de reversión o E_{Cl} experimental para las células dializadas con disoluciones de 130 mM y 12 mM de Cl^- fue de 0,1 y -49,1 mV respectivamente, mientras que en las células registradas con una disolución intracelular basada en el metanosulfonato, el E_{Cl} fue de -60,9 mV. Cabe destacar que atendiendo a la ecuación de Nernst, el potencial de reversión teórico a 22°C para el ión Cl^- , con una concentración extracelular de Cl^- de 150 mM e intracelular de 12 y 130 mM es de -64,2 y -3,6 mV respectivamente; cuando el cloruro disminuye a 2-6 mM, que es la concentración intracelular esperada en las células dializadas con metanosulfonato, el E_{Cl} teórico estaría entre -80 y -100 mV aproximadamente, siendo de -127 mV el valor teórico en ausencia de aniones Cl^- . Esta diferencia entre el E_{Cl} experimental al usar la disolución intracelular sin Cl^- y el reflejado al sustituir las concentraciones de iones en la ecuación de Nernst se puede explicar por dos razones fundamentalmente:

- (1): en la disolución extracelular utilizada para la realización de estas medidas de I_{GABA} no hay bicarbonatos (ver apartado 3.1. de esta sección) y la concentración de HCO_3^- intracelular debería alcanzar una concentración de 15 mM para conseguir el pH 7,2 supuesto en el interior celular. Estos aniones HCO_3^- pueden fluir por los canales GABA_A con una permeabilidad de 0,3 veces la permeabilidad de Cl^- para este canal (Kaila y col., 1989).
- (2): existen dos cotransportadores electroneutros que regulan la concentración de Cl^- intracelular independientemente del potencial de membrana (Payne, 1997; Russell, 2000). Estos $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransportadores están presentes en las dendritas, siendo el NKCC_1 el encargado de acumular Cl^- normalmente y el NKCC_2 el encargado de, fundamentalmente, sacar Cl^- al exterior (Rivera y col., 1999; Delpire, 2000). Estos transportadores tienen el poder de cambiar la dirección de las corrientes generadas por la activación del receptor GABA. Así, un incremento en la expresión del NKCC_2 durante el desarrollo provoca un cambio radical en la concentración de Cl^- intracelular lo que da como resultado que el E_{Cl} sea más negativo que el V_m . Es decir, de ser un neurotransmisor excitador en los primeros estados de desarrollo, GABA pasa a ser el principal neurotransmisor inhibitorio en el animal adulto (Ben-Ari y col., 1994; Rivera y col., 1999; Ganguly y col., 2001).

En resumen, cuando usamos la disolución intracelular basada en metanosulfonato (0 mM Cl^-) esperamos que los cotransportadores eleven la concentración intracelular de Cl^- hasta niveles de 2-6 mM y esta condición junto a la permeabilidad de los canales GABA_A para el anión HCO_3^- permite que el valor experimental obtenido para el E_{Cl} esté cercano al reflejado por la ecuación de Nernst.

Basándonos en estos resultados y puesto que muestra las mayores corrientes al potencial de 0 mV, elegimos la disolución intracelular basada en metanosulfonato y con una concentración de 0 mM de Cl^- como disolución para los experimentos en los que se fijó el potencial de membrana de la célula estudiada a 0 mV. De este modo, tal y como se observa en la figura 16, bajo estas condiciones experimentales registramos corrientes de salida que pueden ser completamente anuladas por la perfusión en el líquido extracelular del antagonista de canales de GABA_A bicuculina (40 μM).

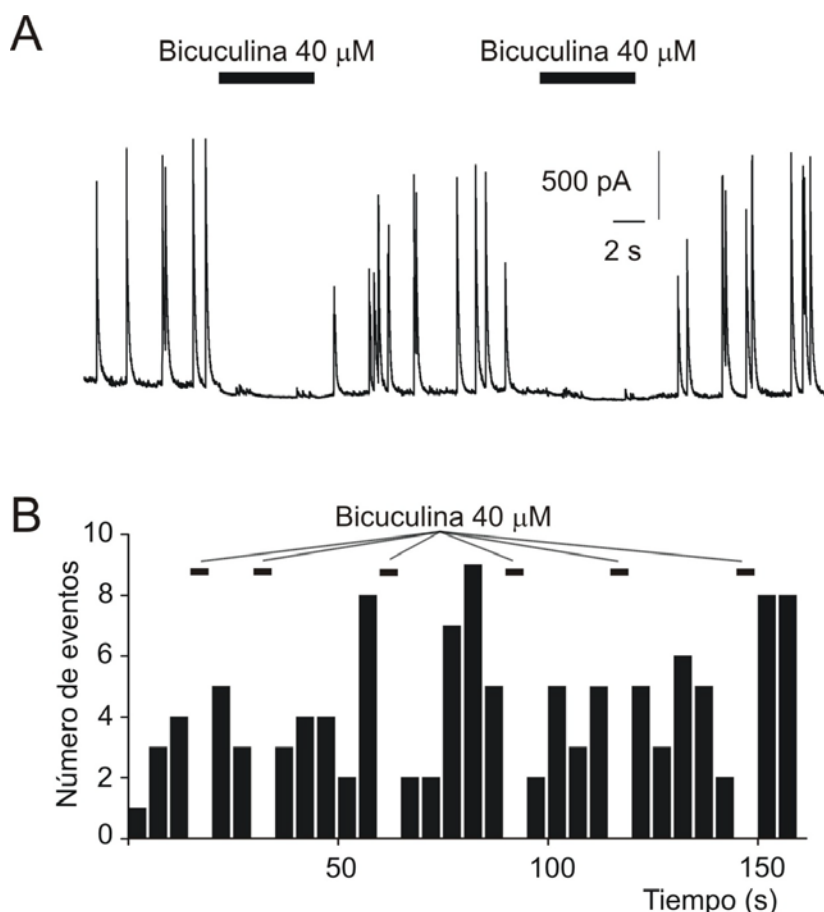


Figura 16. Registro de corrientes sensibles a bicuculina. **A.** Registro de IPSCs en una célula cuyo potencial de membrana ha sido fijado a 0 mV. La aplicación de 40 μ M de bicuculina durante 5 segundos elimina todas las corrientes de salida, sin observarse corrientes resistentes a bicuculina. La actividad espontánea previa se recupera completamente tras el lavado del antagonista GABA_A. **B.** Cuantificación del número de eventos registrados en condiciones control y durante la aplicación durante 5 segundos de bicuculina (barras horizontales). Tamaño de los intervalos representados de 5 segundos.

5. COMPUESTOS QUÍMICOS.

Los componentes químicos utilizados en este trabajo de investigación se obtuvieron de diferentes casas comerciales:

- Sigma-Aldrich (Madrid, España): BSA, papaína, deoxirribonucleasa I, poli-D-lisina, agarosa, colágeno, L-glutamina, bicuculina, atropina, metacolina, acetilcolina, nicotina, GDP- β -S, CNQX, AP-4, AP-5, pirenzepina, 4-DAMP, himbacina, McN-A-343, U73122, 2-APB, QX-314, anfotericina B, GABA, nifedipino y todos los compuestos utilizados para la realización de las diferentes disoluciones.

- GIBCO-Invitrogen (Barcelona, España): DMEM, penicilina/estreptomicina, gentamicina, neurobasal y B27.
- Tocris (Bristol, Inglaterra): TTX, ω -conotoxina GVIA y ω -agatoxina IVA.
- Paa (Pasching, Austria): FBS.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y CÁLCULOS MATEMÁTICOS.

Los datos representados se expresan mediante la media \pm el error estándar de la media (E.S.M.) del número de células reseñado (n: x). Estas células provienen de al menos 3 cultivos diferentes. Para determinar las diferencias estadísticas entre medias los test utilizados fueron: el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test *post hoc* Newman-Keuls; el test de la t de Student. Se estableció que existían diferencias estadísticas significativas cuando el valor de P en estos test era inferior a 0,05 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

El análisis de los resultados se realizó con el programa MiniAnalysis (Synptosoft, Leonia, NJ, USA) y cuando los resultados requerían de un ajuste a una función se usó el programa OriginPro 7.5 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

El ajuste de los datos a una regresión lineal se realizó mediante la fórmula matemática $Y = A + B * X$; los ajustes a una función exponencial de primer grado se efectuaron con la formulación $Y = A * e^{-x/\tau} + y_0$; los ajustes a una exponencial de segundo grado siguieron la ecuación $Y = A_1 * e^{-x/\tau_1} + A_2 * e^{-x/\tau_2} + y_0$.

RESULTADOS

1. Efecto de la activación colinérgica sobre las corrientes postsinápticas espontáneas y el disparo de potenciales de acción en neuronas hipocampales en cultivo.

Una neurona en cultivo recibe constantemente estímulos de las neuronas vecinas. En los cultivos de neuronas de hipocampo de rata, estas señales se traducen como excitaciones (señales glutamatérgicas) o inhibiciones (transmisión GABAérgica) que, dependiendo del modo de la técnica de *patch clamp* utilizado para su registro, desencadenaran diferentes respuestas. En el caso de los registros efectuados en el modo fijación de voltaje se registrarán corrientes postsinápticas de entrada o salida, dependiendo de los potenciales de equilibrio de los iones implicados. En el modo fijación de corriente, la sumación de las señales excitadoras e inhibidoras variará el potencial de membrana (V_m) de la célula registrada, produciendo un potencial de acción (PA) si esta sumación eleva el V_m por encima del umbral de disparo.

Tanto las interneuronas (Alkondon y col., 1999) como las células principales (Cole y Nicoll, 1984) responden a la activación de receptores colinérgicos que provocan el disparo de PAs. Nosotros hemos explorado el efecto de la aplicación de diferentes agonistas colinérgicos sobre neuronas de hipocampo en cultivo.

Usando la configuración de “parche perforado” en el modo de fijación de corriente, exploramos 11 neuronas con una conectividad baja, para asegurarnos de no tener muchas interferencias de las células vecinas (figura 17). En estas condiciones observamos que el potencial de membrana en reposo de las células estudiadas fue de -54 ± 3 mV, el umbral de disparo de los potenciales estaba alrededor de -40 mV y éstos tenían un sobretiro que alcanzaba los $+10$ mV. Sobre estas condiciones control se procedió a la aplicación de diferentes agonistas colinérgicos durante 5 s: el agonista endógeno acetilcolina (ACh) a una concentración de $300 \mu\text{M}$, que activa tanto los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) como los receptores muscarínicos (mAChRs); nicotina $100 \mu\text{M}$ capaz de activar los nAChRs; $100 \mu\text{M}$ de metacolina (MCho), agonista selectivo de los mAChRs.

La activación de los diferentes receptores colinérgicos afectó de forma distinta al V_m de las células estudiadas. El V_m registrado en la situación control fue de -54 ± 3 mV. La aplicación de 5 s de nicotina produjo una pequeña hiperpolarización en las células, llevando el V_m a valores de -69 ± 8 mV, mientras que la aplicación del agonista muscarínico MCho produjo una despolarización sostenida aumentando el V_m a -35 ± 2

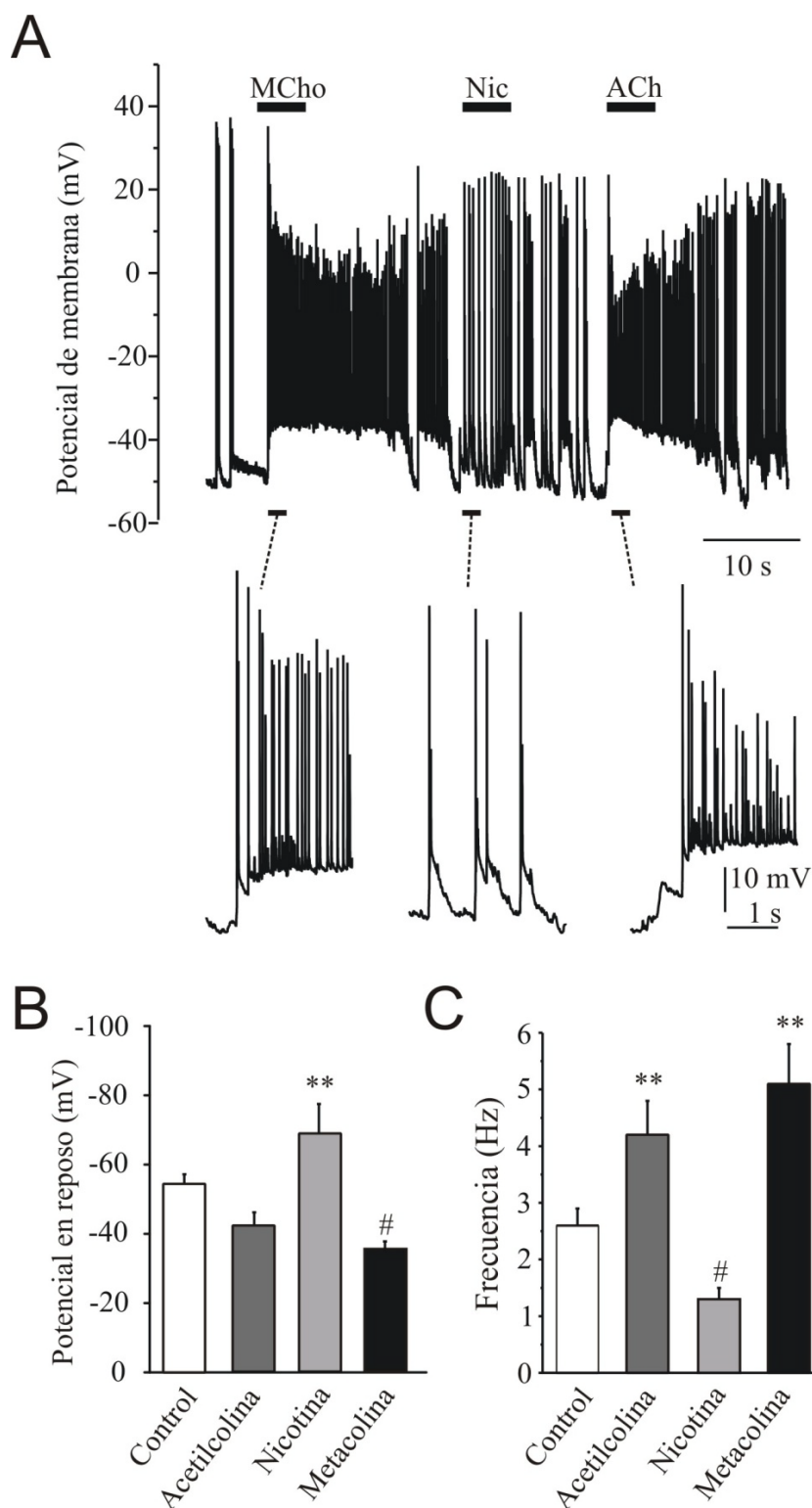


Figura 17. Aumento de la excitabilidad celular por la aplicación de agonistas colinérgicos. **A.** Potenciales de acción registrados en una célula modelo en condiciones control y tras la aplicación de 5 s de agonistas colinérgicos, metacolina 100 μ M (MCh), nicotina 100 μ M (Nic) y acetilcolina 300 μ M (ACh) tal y como muestran las barras horizontales. Las ampliaciones muestran el momento de la aplicación del agonista a otra escala temporal. **B.** Diagrama de barras del valor medio del potencial en reposo en las diferentes condiciones (ANOVA $F_{3,27} = 14,76$, $p < 0,001$) ** $p < 0,01$ vs. control, ACh y MCh; # $p < 0,05$ vs. control. **C.** Frecuencia de disparo de PAs durante la aplicación de los agonistas colinérgicos (ANOVA $F_{3,27} = 9,04$, $p < 0,001$) ** $p < 0,01$ vs. control y Nic; # $p < 0,05$ vs. control. Los datos representan la media \pm E.S.M. (n:11).

mV. La doble estimulación de nAChRs y mAChRs por ACh despolarizó débilmente la membrana plasmática llevando el valor de V_m a -43 ± 3 mV (panel B).

Estos valores de V_m se reflejan a la hora de cuantificar el número de PAs generados en cada condición experimental. Así, la aplicación de 100 μ M de nicotina disminuyó significativamente la frecuencia de disparo de las neuronas ($1,3 \pm 0,2$ Hz) comparándola con la frecuencia de PAs en la situación control ($2,6 \pm 0,3$ Hz) ($F_{3,27} = 9,04$; $p < 0,05$). Por otro lado, la aplicación de MCho produjo en el 75% de las neuronas registradas un claro aumento en la frecuencia de disparo de las mismas ($5,1 \pm 0,7$ Hz) comparándolo con la situación control ($F_{3,27} = 9,04$; $p < 0,01$). En el otro 25 % de las neuronas la aplicación de MCho, a una concentración de 100 μ M, no conllevó variaciones en la frecuencia de disparo ni despolarización. Al igual que MCho, la aplicación de ACh produce un aumento en la frecuencia de los PAs ($4,2 \pm 0,6$ Hz) significativamente mayor que en la situación control y nicotina ($F_{3,27} = 9,04$; $p < 0,01$), pero sin modificar estadísticamente el V_m (panel C).

Estudiando con más detalle los parámetros biofísicos de los PAs en la situación control, tras la activación de los nAChRs, de los mAChRs o de ambos observamos algunas diferencias que se reflejan en la tabla 5. Tras contabilizar 585, 250, 1 097 y 1 326 PAs en la situación control, nicotina, ACh y MCho respectivamente, en las 11 neuronas estudiadas, destacamos que el efecto de nicotina sobre la frecuencia de disparo lleva asociado un aumento en el anchura media y el área de los PAs con respecto a las características de los PAs espontáneos ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente).

La aplicación de los agonistas capaces de activar la respuesta muscarínica también aumentan la anchura de los PAs ($p < 0,01$ tanto para ACh como para MCho) pero no modifican el área de los potenciales, posiblemente por la disminución de la amplitud de los mismos ($p < 0,01$ en ambos casos) y por la mayor rapidez en la formación de los PAs ($p < 0,01$ igualmente).

En la figura 18 se muestra a título de ejemplo un grupo de experimentos que están realizados con una disolución intracelular con 149 mM de iones cloruro que impedirían aislar corrientes GABAérgicas de salida a un potencial de fijación de 0 mV (ver sección III), pero que permiten dar una visión del efecto de la aplicación de MCho (ver sección II) al pasar del modo de fijación de corriente al de fijación de voltaje, manteniendo el V_m fijado en -70 mV y observando corrientes postsinápticas de entrada de unos 10 nA.

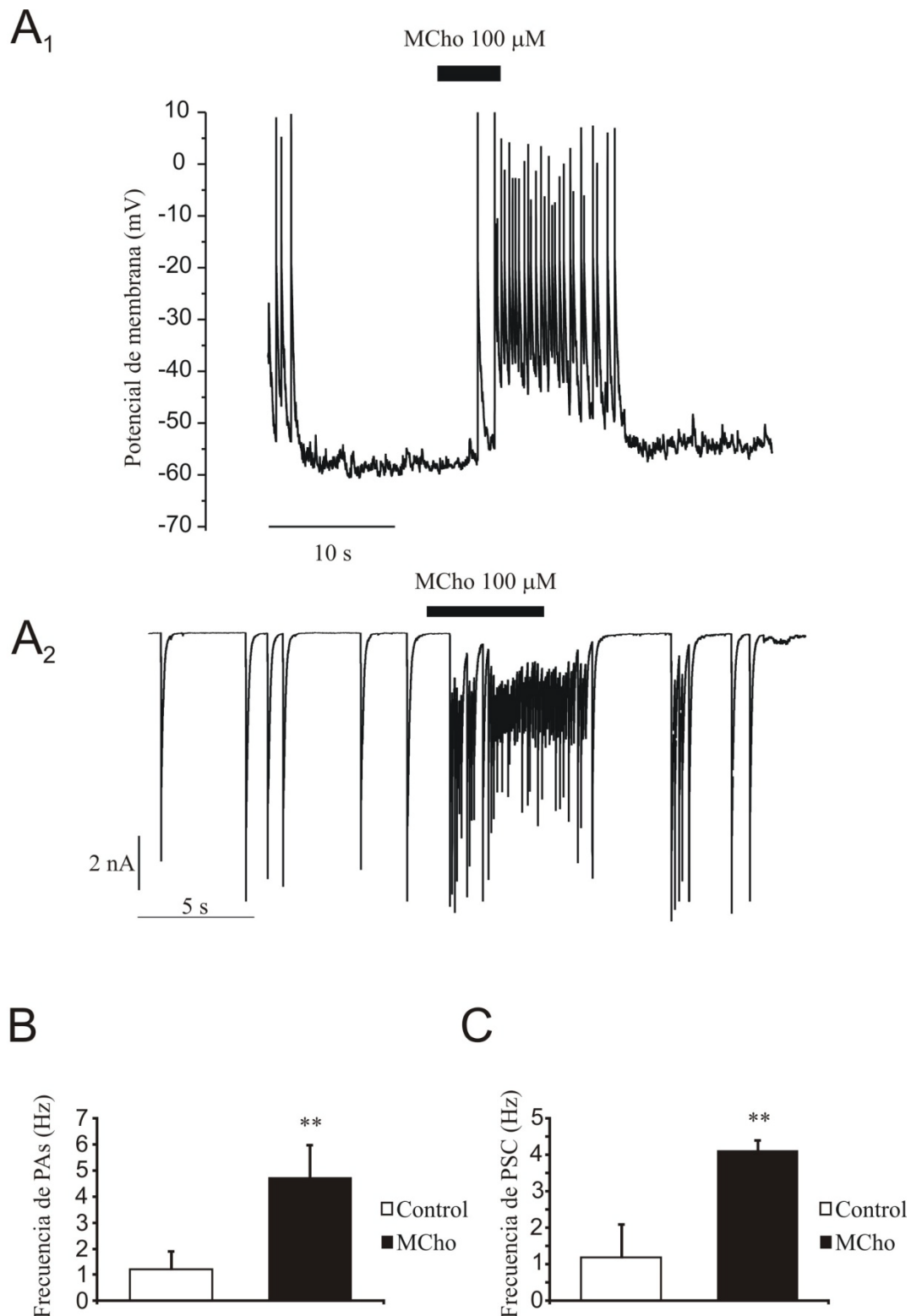


Figura 18. Aumento de la excitabilidad celular por la activación de mAChRs. **A₁**. Disparo de PAs provocados por la aplicación de MChO 100 μ M durante 5 s tal y como marca la barra horizontal. **A₂**. Registro de corrientes postsinápticas en la misma neurona. Se observan corrientes de entrada a un potencial de fijación de voltaje de -70 mV. **B**. Diagrama de barras de frecuencias de disparo de PAs. **C**. Representación de la frecuencia de disparo de corrientes postsinápticas (PSC). Los datos están representados como la media \pm E.S.M. n: 6. ** $p < 0,01$ tras test de t de Student.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de los PAs registrados en cada condición experimentales

	Amplitud (mV)	Subida ₁₀₋₉₀ (ms)	Declive (ms)	Área (mV·ms)	Anchura media (ms)
Control	79,5 ± 2	1,9 ± 0,4	38,7 ± 1,5	357 ± 47	1,4 ± 0,1
Nicotina	70,5 ± 2	2,5 ± 0,1	40,2 ± 0,3	873 ± 60**	1,9 ± 0,1
Metacolina	40,3 ± 1**	6,7 ± 0,3**	37,5 ± 0,7	311 ± 90	3,4 ± 0,1**
Acetilcolina	37,7 ± 1**	5,2 ± 0,4**	34,7 ± 1,2	280 ± 13	3,6 ± 0,1**

Los datos están representados como la media ± E.S.M. *p < 0,5; **p < 0,01 con respecto a la condición control.

En 6 células en las que se aplica durante 5 s una disolución con 100 µM de MChO, se produjo tanto una despolarización y el consiguiente disparo de PAs cuando se fijó la corriente, como un aumento en la frecuencia de corrientes postsinápticas cuando era el voltaje el que estaba fijado a un potencial de membrana de -70 mV.

El análisis estadístico refleja que la aplicación del agonista muscarínico aumenta en estas células la frecuencia de disparo de los PAs (4,1 ± 0,3 Hz) con respecto a la situación control (1,2 ± 0,9 Hz) (p < 0,01). En el caso de las corrientes postsinápticas espontáneas ocurre algo similar pasando de una frecuencia de 1,4 ± 0,6 Hz en situación control a 4,9 ± 1,2 Hz con la aplicación de 5 s de MChO 100 µM (p < 0,01).

2. Características de las IPSCs generadas al activar los nAChRs y/o mAChRs.

Tras haber estudiado el disparo de PAs de las neuronas de hipocampo mediado por la activación de receptores colinérgicos, nos planteamos el estudio de las corrientes GABAérgicas de estas células. Usando la metodología diseñada para el registro de estas corrientes, en condiciones de fijación de voltaje a 0 mV, utilizamos el mismo protocolo de aplicación de agonistas colinérgicos usado en el estudio de PAs. Cabe recordar, que tal y como se especifica en la sección III, para la evaluación de estas corrientes usamos una disolución intracelular basada en el metanosulfonato (0 mM de Cl⁻).

Con esta estrategia conseguimos visualizar las corrientes de salida provocadas por la activación de los receptores GABA_A de la célula postsináptica. La aplicación durante 5 s de los agonistas colinérgicos usados para el estudio de PAs, generó una salva de corrientes postsinápticas diferenciadas claramente de la actividad basal registrada.

Como se puede observar en la figura 18, la aplicación de 5 s de una concentración de 100 µM de nicotina provoca un aumento brusco y rápido de la frecuencia de IPSCs, pero estas corrientes están sujetas a una rápida desensibilización a lo largo de la

aplicación del agonista nicotínico. La aplicación de MCho 100 μ M produce igualmente un claro incremento en el registro de IPSCs, que se caracteriza por tener una duración claramente superior al tiempo de aplicación del agonista muscarínico, pero con una marcada demora en el comienzo del efecto. Una vez lavado el agonista la actividad basal de la célula estudiada vuelve a los niveles control tras un breve lapso de tiempo. Con la aplicación de ACh 300 μ M tenemos un efecto mixto entre las dos situaciones anteriores, posiblemente debido a la activación conjunta de nAChRs y mAChRs. Las características de la salva de corrientes registradas mantendrían la rápida respuesta a agonista propia de la activación de nAChRs, una duración prolongada en el tiempo gracias a la activación de mAChRs y una pronta recuperación de la actividad previa.

Hay que destacar que la respuesta a agonistas colinérgicos es reproducible en la misma célula, sin observarse signos de desensibilización a lo largo de las diversas aplicaciones. Sin embargo, sí se observan pequeñas diferencias cuando se compara el efecto de los mismos en células provenientes de diferentes cultivos, probablemente debido a la heterogeneidad en el número de contactos sinápticos presentes en la célula estudiada, aunque no impide la realización de estudios estadísticos dirigidos a la cuantificación de los efectos observados.

La cuantificación de los resultados obtenidos en las 10 células sometidas al protocolo mostrado en el panel A de la figura 19, se muestra en los paneles B-E, donde se observan las diferencias en la latencia y duración del efecto, así como el sumatorio de la carga neta registrada durante el periodo establecido para su estudio. La activación de los nAChRs se produce tras un breve lapso de tiempo ($0,61 \pm 0,1$ y $0,71 \pm 0,1$ s, tras la aplicación de nicotina y ACh respectivamente), mientras que se observa una latencia mayor en el inicio de la salva de corrientes tras la activación de los mAChRs ($3,69 \pm 1,1$ s).

La duración del efecto tras la aplicación de los diferentes agonistas colinérgicos se sometió a un estudio estadístico que queda reflejado en el panel C de la figura 18. Aquí observamos que la generación de la salva de corrientes por la aplicación de nicotina durante 5 s sufrió una desensibilización ($3,1 \pm 0,4$ s) al compararla con el efecto de la perfusión de ACh ($6,1 \pm 0,2$ s). Sin embargo, la duración del efecto fue significativamente mayor al activar los receptores muscarínicos con el agonista MCho ($9,6 \pm 1,9$ s) ($F_{2,25} = 11,48$, $p < 0,01$).

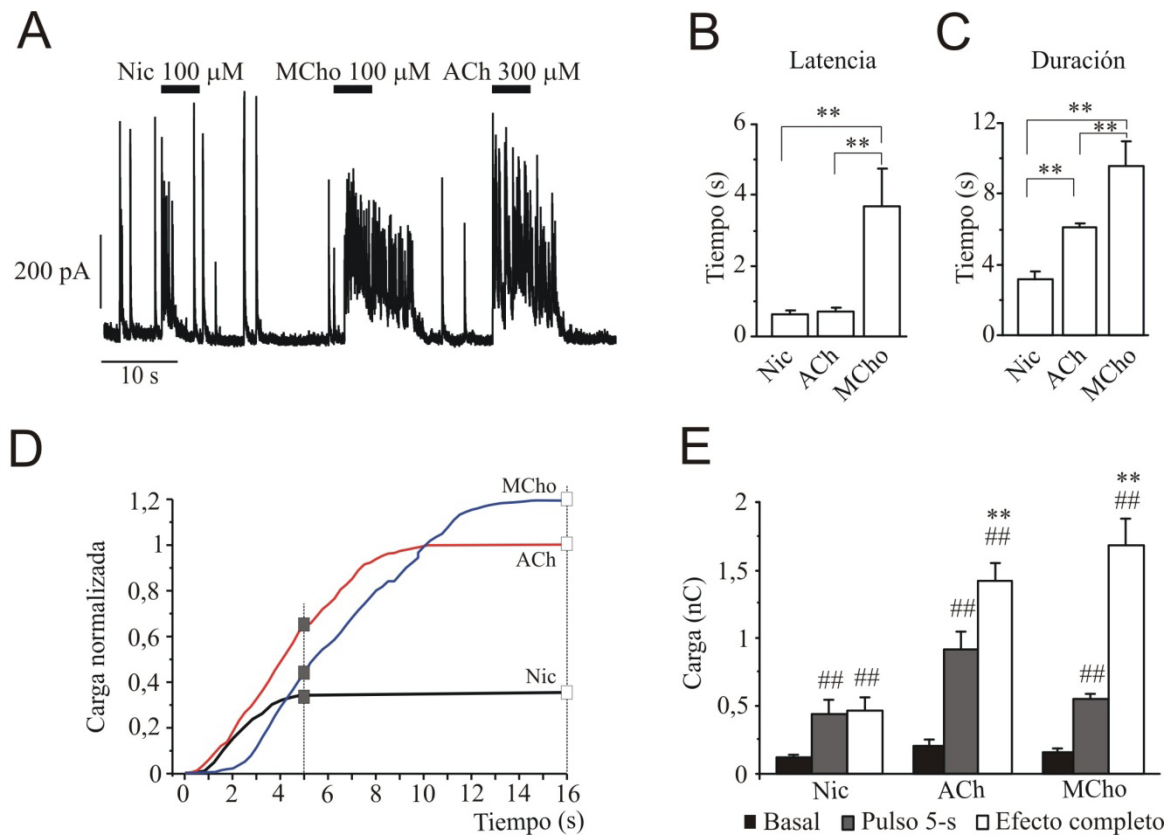


Figura 19. Aumento de la actividad sináptica inhibitoria mediada por la aplicación de agonistas colinérgicos. **A.** Trazo del registro de una célula modelo cuyo potencial de membrana ha sido fijado a 0 mV. Tal y como muestran las barras horizontales se aplicó durante 5 s una concentración de 100 μ M de nicotina (Nic), 100 μ M de metacolina (MCh) y 300 μ M de acetilcolina (ACh). **B-C.** Cuantificación del tiempo de latencia de inicio y duración de la salva tras la aplicación de los agonistas $**p < 0,01$. **D.** Curso temporal de la célula modelo donde se observa la acumulación neta de carga durante 16 s de registro desde el inicio de la aplicación del agonista. La carga fue normalizada al efecto máximo en la aplicación de ACh. **E.** Diagrama de barras donde se representan las medias de la carga neta en cada condición experimental. La barra negra muestra la carga basal media. En la barra gris representamos la carga originada durante la aplicación de agonista (5 s) y en la barra blanca la carga total registrada durante 16 s tras la aplicación del mismo $##p < 0,01$ frente a basal; $**p < 0,01$ frente al pulso de 5 s. Los datos están representados como la media \pm E.S.M. $n:10$. Para determinar las diferencias entre medias se realizó un ANOVA de un vía $F_{3,29} = 5,53$, $p < 0,01$ seguido del test de Newman-Keuls.

En el panel D de esta misma figura mostramos el curso temporal de la célula mostrada en el panel A, que sería representativa de la media, contabilizando la carga total desde el inicio de la aplicación de agonista. Decidimos normalizar la carga total de la aplicación de 300 μ M de ACh para así poder comparar los resultados obtenidos tras la activación de nAChRs y mAChRs. El muestreo se realizó cada 200 ms y se finalizó a los 16 s tras la aplicación de agonista. La elección de este último tiempo para la determinación de la carga total acumulada se decidió por ser el mayor tiempo de duración de efecto registrado en las 10 células estudiadas en este grupo experimental.

Cabe destacar que este tiempo de 16 s será aplicado como el tiempo de cuantificación de todas las cargas de corrientes estudiadas en esta tesis, así como será la referencia para establecer el tiempo de medida previo a la aplicación de agonista, para determinar la actividad basal contra la que será enfrentada en los estudios estadísticos.

El resumen de las características de la activación diferencial está cuantificado en el panel E y definiría la activación de los nAChRs como rápida y desensibilizante, mientras que otorgaría las características de lenta y duradera a la activación de los mAChRs. La carga total acaecida durante los 5 s de aplicación de agonista está representada en el panel D y E por el color gris, mientras que en las barras blancas se muestra la carga final resultante de la aplicación del agonista. En cada caso, los valores obtenidos se enfrentan a la situación basal previa a la aplicación de agonista $0,12 \pm 0,01$; $0,20 \pm 0,04$ y $0,16 \pm 0,2$ nC para la situación nicotina, ACh y MChO respectivamente. En lo relativo a la carga cuantificada durante los 5 s de perfusión de los agonistas, los valores medios obtenidos fueron $0,43 \pm 0,1$ (nicotina); $0,91 \pm 0,1$ (ACh) y $0,55 \pm 0,03$ nC (MChO), siendo la ACh la más eficaz a este tiempo, mientras que el menor efecto se cuantificó tras la activación de los nAChRs por nicotina. Todas ellas fueron significativamente mayores que sus respectivas basales ($p < 0,01$). Sin embargo, cuando se cuantificó la carga total durante los 16 s siguientes a la administración de los fármacos, los datos obtenidos fueron de $0,47 \pm 0,1$; $1,47 \pm 0,3$ y $1,67 \pm 0,2$ nC (nicotina, ACh y MChO respectivamente). La nicotina no mostró ningún tipo de efecto de larga duración, mientras que tanto ACh como MChO mostraron un efecto de mayor duración que el tiempo de aplicación del fármaco ($p < 0,01$). Al contrario que en la carga a 5 s, en esta ocasión es la MChO la que se muestra mucho más eficaz que ACh a la hora de activar los mAChRs.

3. La modulación muscarínica de las IPSCs es insensible a bloqueadores de los receptores glutamatérgicos.

Tal y como mostramos en la figura 16 de la sección III, las IPSCs registradas con una disolución intracelular sin Cl^- y con el potencial de membrana fijado a 0 mV son sensibles a bicuculina, un bloqueante de los receptores GABA_A . Sin embargo desconocemos si, en estas condiciones experimentales, el uso de antagonistas glutamatérgicos afectaría al registro de IPSCs.

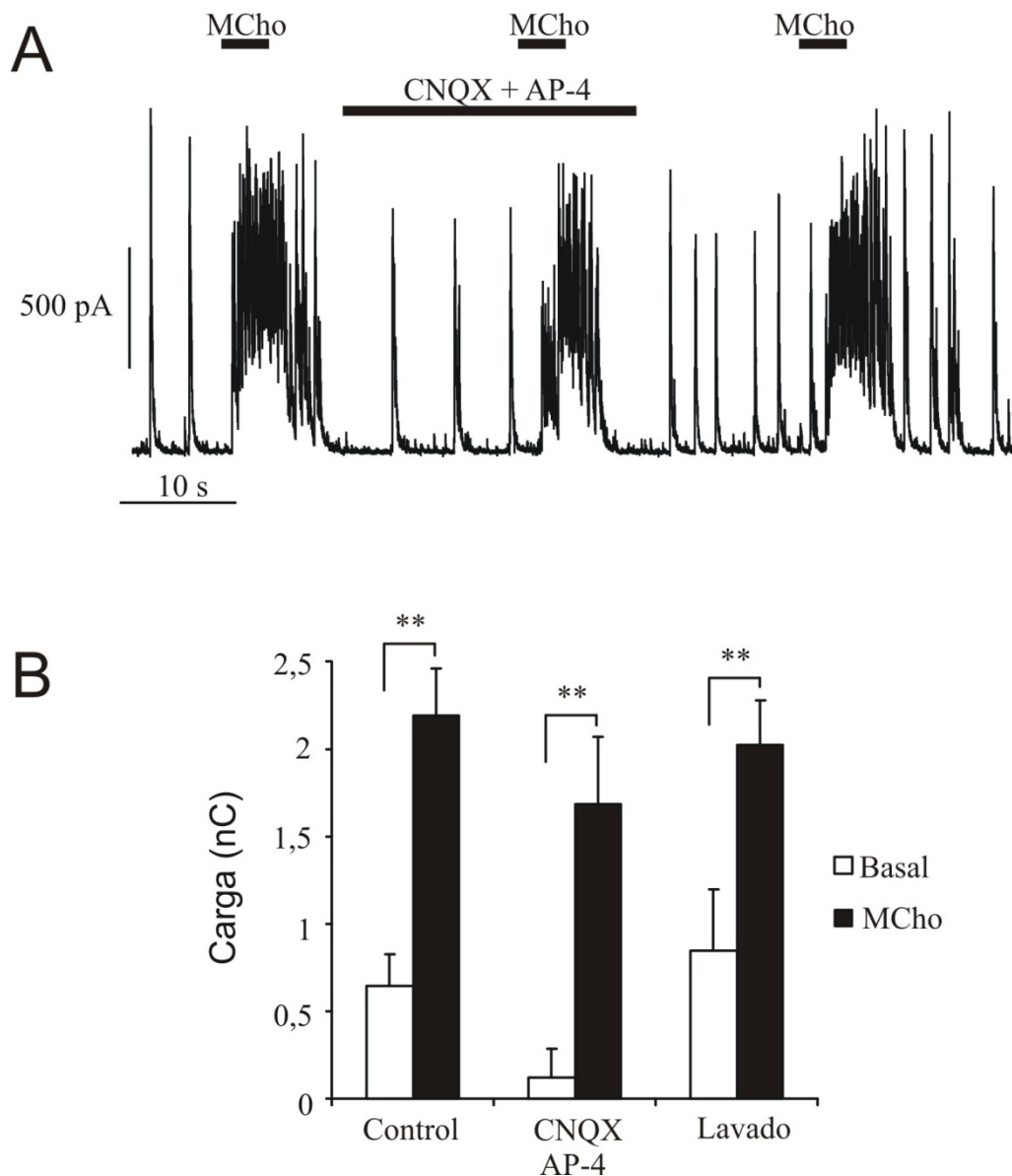


Figura 20. Efecto de los antagonistas glutamatérgicos sobre la potenciación ejercida por MChR en las IPSCs. **A.** Registro representativo en una célula con el potencial de membrana fijado a 0 mV. Se aplicó durante 5 s una concentración de 100 μ M de MChR tal y como muestran las barras horizontales antes y después de la misma aplicación en presencia de 10 μ M de CNQX y 50 μ M de AP-4, que previamente habían sido administrados durante 30 s. **B.** Diagrama de barras que muestra la carga total de la actividad basal (barra blanca) y de la carga provocada por la aplicación de MChR (barra negra). Datos representados por la media \pm E.S.M. n:14. **p < 0,01 (test t de Student).

Una vez que hemos comprobado que la transmisión GABAérgica viene modulada tanto por la activación de receptores nicotínicos como muscarínicos nos centramos en el objetivo principal de este trabajo de investigación, la modulación muscarínica de la transmisión GABAérgica.

En este grupo de experimentos, quisimos valorar si la potenciación de la transmisión inhibitoria observada por la activación de los mAChRs por MChR está

influida, de algún modo, por la participación de la transmisión glutamatérgica. Para ello, nos valimos de bloqueadores de los receptores glutamatérgicos; concretamente CNQX (10 μ M), antagonista selectivo de los receptores AMPA y kainato de glutamato, y AP-4 (50 μ M), bloqueador selectivo de los receptores NMDA. Ambos fueron añadidos a la disolución extracelular Tyrode y se administraron durante 30 s antes y durante la aplicación de 100 μ M de MCho. Es decir, el protocolo de administración de fármacos en este grupo de experimentos consistió en aplicar un primer pulso de 5 s de MCho 100 μ M, para caracterizar la respuesta celular, un segundo pulso igualmente de 5 s de MCho coaplicado con los bloqueadores glutamatérgicos previamente administrados durante 30 s y, tras un periodo de lavado de al menos 30 s, un tercer pulso, también 5 s, de MCho para corroborar que se recuperan las características originales del registro (figura 20).

El análisis de los datos sugiere que la acción de la MCho sería sobre interneuronas GABAérgicas, puesto que no se observan diferencias significativas al bloquear la transmisión glutamatérgica de las células principales. Cuantitativamente la aplicación de 100 μ M de MCho, en un total de 14 células, produce un aumento de la carga durante los 16 s analizados de unas 3-4 veces la carga basal ($2,18 \pm 0,28$, $p < 0,01$). Tras la aplicación de los antagonistas glutamatérgicos la subsiguiente aplicación de 100 μ M de MCho produce una potenciación que se ve equiparada a la situación control ($1,7 \pm 0,4$ nC) ($p < 0,01$ tras la aplicación del test t de Student frente a la basal). De igual manera, tras el lavado de los antagonistas glutamatérgicos, se sigue manteniendo la potenciación de las IPSCs provocada por la aplicación de 5 s de MCho.

4. Efecto de atropina sobre la potenciación de las IPSCs provocada por la activación de mAChRs.

Para consolidar la hipótesis de que la activación de los mAChRs ocasiona la potenciación de las IPSCs, decidimos usar una concentración 1 μ M de atropina, antagonista de los mAChRs.

En panel A de la figura 21 mostramos una célula en la que se ha aplicado durante 1 minuto una concentración de atropina 1 μ M, suficiente para bloquear una posible modulación intrínseca por ACh de la red neuronal. Para facilitar la observación y enfatizar el posible efecto, se buscaron células con una alta conectividad. No se observaron diferencias en los parámetros biofísicos y la frecuencia de las IPSCs

analizadas en estas células (n:7), por lo que descartamos un tono colinérgico en nuestro sistema.

Tras efectuar esta comprobación, nos planteamos evaluar si MCho 100 μ M era capaz de seguir produciendo una salva de corrientes en presencia del bloqueante de los mAChRs. Para ello diseñamos un protocolo similar al de la aplicación de los antagonistas glutamatérgicos. Primeramente, nos aseguramos que la célula estudiada presentaba una respuesta enérgica a la aplicación de MCho 100 μ M durante 5 s. Una vez provocado el primer disparo de salvas de corrientes postsinápticas, procedimos a la administración de atropina 1 μ M, de tal forma que el antagonista de los mAChRs estaba presente 10 s antes, durante y 5 s después de la aplicación del pulso de 5 s de MCho. Después de esta perfusión de 20 s de atropina se lavaron los fármacos y se comprobó si se mantenía la cualidad inicial de potenciación de las IPSCs inducida por MCho. Como se puede observar en el panel B de la figura 21, la presencia de atropina en nuestro sistema impide la potenciación provocada por MCho. Una vez lavado el antagonista se recupera la potenciación inducida por MCho. Este mismo resultado se repitió en un total de 10 células sometidas a este protocolo.

A la vista de estos resultados, MCho está activando selectivamente los mAChRs presentes en el sistema, pero nos quedó la duda de qué ocurre con el agonista endógeno. Fisiológicamente, en el hipocampo se produce una liberación de ACh (ver sección I) que activaría tanto a los nAChRs como a los mAChRs. Por ello decidimos realizar un estudio, en 10 células, de la capacidad de atropina de bloquear la salva de corrientes postsinápticas inhibitoras inducida por la aplicación en la red neuronal de 300 μ M de ACh durante 5 s (panel C de la figura 21). Como quedó demostrado en la figura 19, ACh a una concentración de 300 μ M es capaz de generar el disparo de una salva de IPSCs. La preaplicación de atropina 1 μ M disminuyó parcialmente este efecto, de una forma reversible. Como se puede observar en el panel D, la duración y carga del disparo de corrientes se vieron disminuidas en presencia del antagonista muscarínico, en un 55% en el caso de la duración (de $8,5 \pm 0,5$ s a $3,9 \pm 0,4$ s, $p < 0,01$) y en un 60% en el caso de la carga total analizada (de $1,2 \pm 0,2$ nC a $0,48 \pm 0,2$ nC, $p < 0,01$). Sin embargo, atropina no modificó la latencia del efecto de ACh ($0,65 \pm 0,15$ s, $0,66 \pm 0,21$ s para ACh y ACh + atropina respectivamente). Por tanto podemos decir que la presencia de atropina en el sistema equipara el efecto de ACh 300 μ M al de nicotina 100 μ M, puesto que elimina el componente muscarínico de la actividad de ACh.

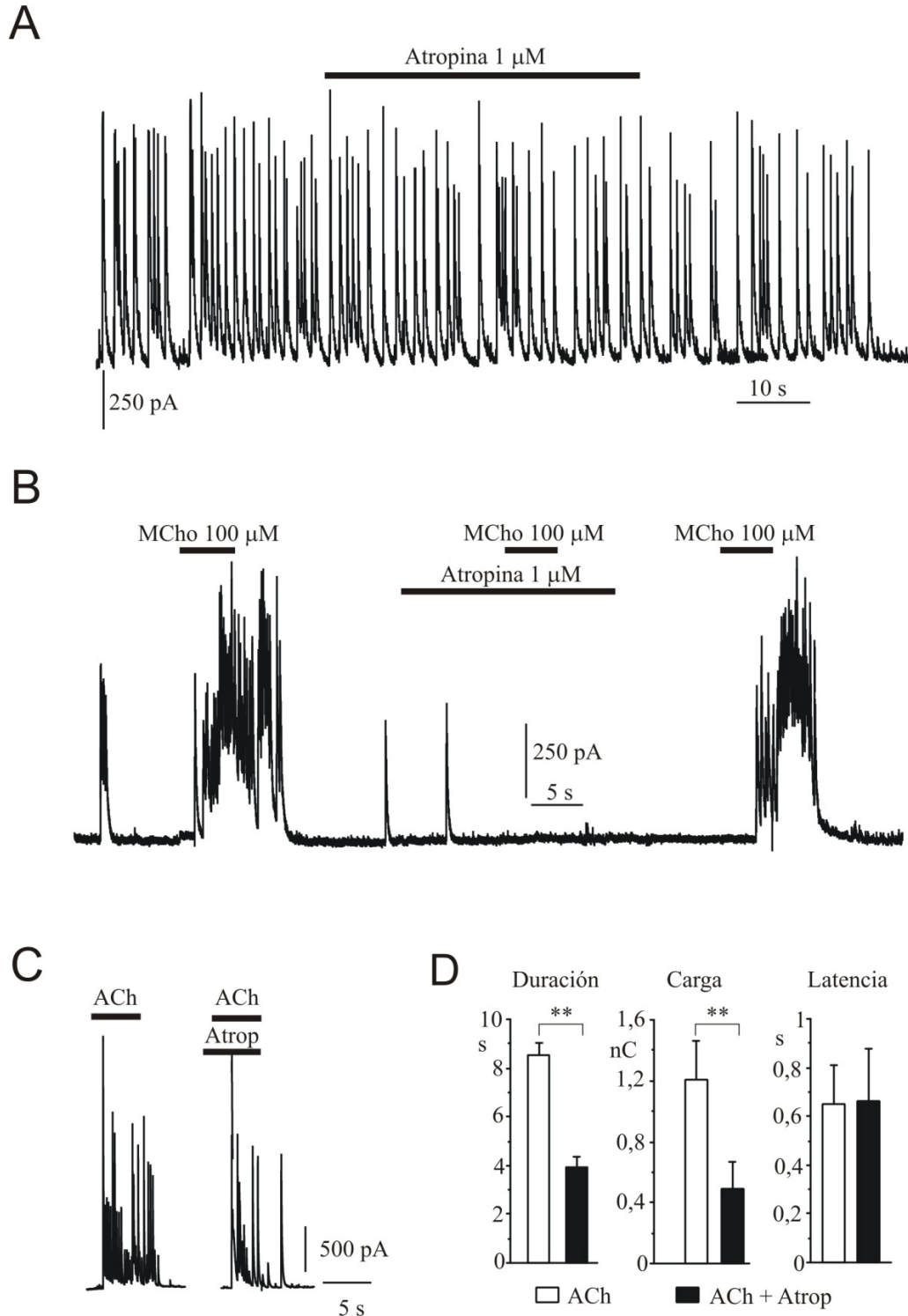


Figura 21. La presencia de atropina impide el disparo en salvas de las IPSCs activadas por mAChRs. **A.** Registro representativo de una célula cuyo potencial de membrana ha sido fijado a 0 mV. La actividad postsináptica no se ve alterada por la presencia durante 1 minuto del antagonista de los mAChRs atropina 1 μM . **B.** Registro obtenido de una célula representativa de la media en el que la potenciación provocada por MChol se ve completamente suprimida por la preadministración de atropina. **C.** Trazos obtenidos de una célula modelo en la que se administra 300 μM de ACh sola y en presencia de atropina (Atrop, 1 μM). **D.** Representación de los datos medios de 10 células sometidas al protocolo del panel C. Se muestran la duración, carga y latencia de la potenciación provocada por ACh 300 μM antes y durante la perfusión de atropina 1 μM . Los datos están representados como la media \pm E.S.M. ****** $p < 0,01$ (test de t de Student).

5. La potenciación muscarínica de las IPSCs no está relacionada con la activación postsináptica de receptores metabotrópicos.

Una de las primeras preguntas que nos planteamos tras la observación del aumento brusco y prolongado de las IPSC, por la aplicación de un agonista muscarínico, fue si la MChol estaba interactuando a nivel pre o postsináptico.

Para evaluar la posibilidad de que el efecto de potenciación en la transmisión GABAérgica fuese por una acción postsináptica decidimos incluir en la disolución intracelular 500 μM de una sal de trilitio guanosina 5'-[β -tio] difosfato (GDP- β -S análogo no hidrolizable del GDP que impide la reactivación de las proteínas G por competencia con el GDP endógeno). Nada más romperse el sello de alta resistencia se fija el potencial de membrana de la célula postsináptica a 0 mV y se aplica un primer pulso de 5 s de MChol 100 μM . En este tiempo el GDP- β -S no ha tenido tiempo suficiente para dializar toda la célula e intercambiarse por el GDP de la proteína G. La carga resultante sirve como punto de normalización para los siguientes pulsos de MChol que fueron aplicados a intervalos de 30 s (ver figura 22). Tras 3 minutos de registro y diálisis intracelular, tiempo suficiente para haber reemplazado todo el GDP endógeno (Elhamdani y col., 1995), la presencia de GDP- β -S 500 μM en el interior celular no modifica la carga de las salvas de IPSCs potenciadas por la activación de mAChRs.

El panel B de la figura 22 también sirve para certificar la ausencia de desensibilización del efecto por aplicaciones consecutivas del agonista muscarínico, tal y como se observa por el histograma cuantitativo de un total de 11 células sometidas a este protocolo.

Este resultado sugiere que la potenciación de la transmisión GABAérgica conseguida por MChol no está mediada por la activación de receptores acoplados a proteína G a nivel de la neurona postsináptica. Esto es un claro indicativo que no hay mecanismos postsinápticos implicados en la acción moduladora de la MChol sobre las IPSCs.

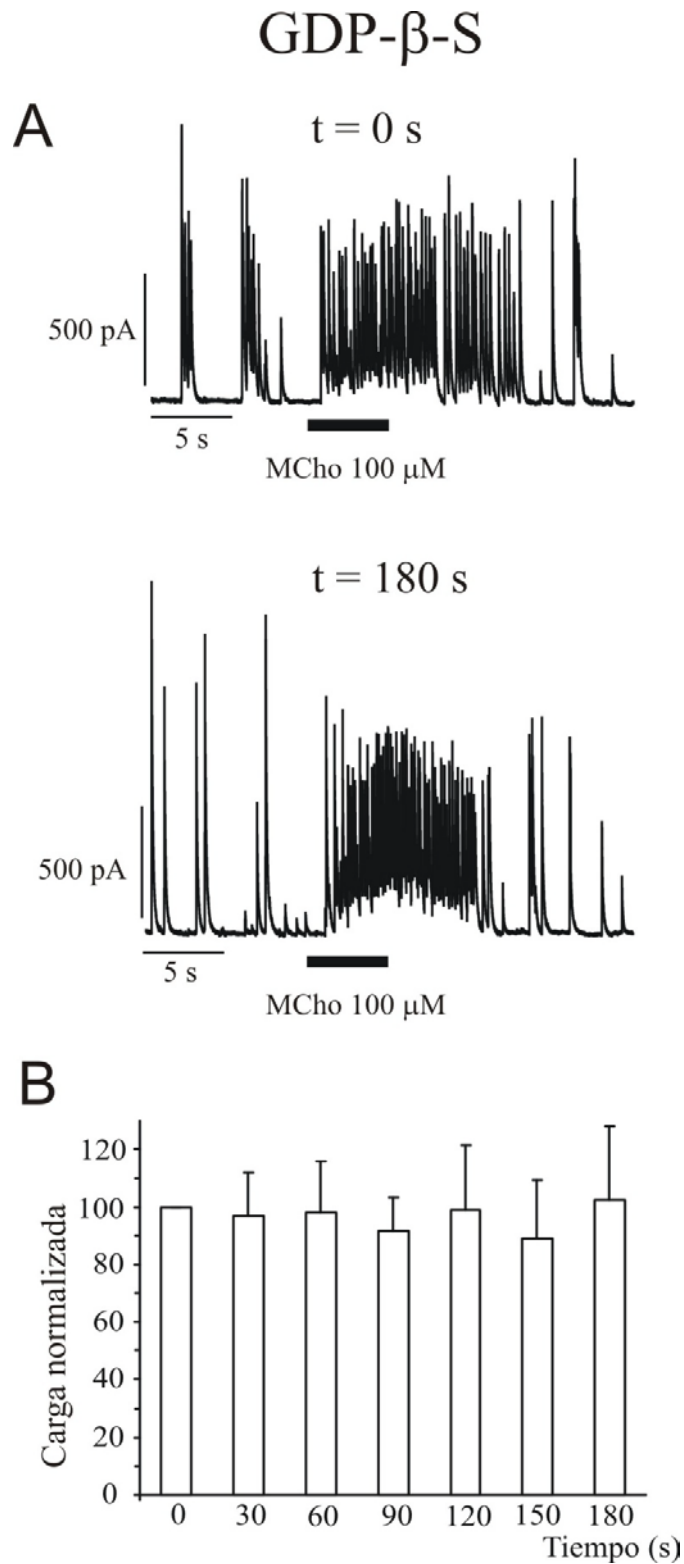


Figura 22. La potenciación ejercida por MCh no es eliminada por la diálisis intracelular de GDP- β -S 500 μ M. Se aplicaron pulsos de 5 s de MCh 100 μ M a intervalos de 30 s en células fijadas a 0 mV. **A.** Trazos originales de una célula modelo. En el trazo superior mostramos la primera salva de corrientes provocada por MCh nada más abrir el sello ($t = 0$ s) y en el inferior la séptima aplicación de MCh ($t = 180$ s). **B.** Histograma representativo de la aplicación cada 30 s de MCh 100 μ M. La carga del primer pulso fue normalizada para equiparar las distintas células. Los datos están representados como la media \pm E.S.M. n:11.

6. La aplicación de MCho induce un incremento de la liberación cuantal de GABA.

Tal y como se demuestra en el apartado anterior, descartamos un efecto postsináptico mediado por la activación de proteínas G presentes en la célula registrada. Pero cabe la posibilidad que la MCho esté actuando a nivel postsináptico modificando las propiedades del receptor GABA_A por acción directa o a través de un mecanismo no mediado por proteína G.

Para el estudio de esta posibilidad nos valimos de las denominadas corrientes miniatura (mPSCs). Éstas representan la liberación, estocástica e independiente de PAs, de vesículas sinápticas aisladas. La modificación de los parámetros biofísicos de estas mPSCs, principalmente la amplitud de las mismas, determinaría un efecto postsináptico. Además, el estudio de las mPSCs nos daba la oportunidad de valorar un efecto presináptico, puesto que la variación en la frecuencia de este tipo de eventos se considera un indicativo de este suceso.

Ya que estas corrientes se definen como independientes de PAs, para su estudio es necesario añadir a la disolución extracelular una concentración de 1 μ M de TTX, que bloquea los canales de Na⁺ dependientes de voltaje e impide la generación y propagación de PAs. Como mostramos en el panel A de la figura 23, partimos de células que presentan en situación control una clara respuesta a la aplicación durante 5 s de MCho 100 μ M (con las características anteriormente definidas de larga duración en la repuesta tras una breve latencia en el inicio del efecto). La aplicación de TTX 1 μ M produce la eliminación de las IPSCs, detectándose únicamente las mPSCs (panel B), pero no impide el efecto en el aumento de la frecuencia de las mismas inducido por la administración del agonista muscarínico MCho 100 μ M.

De hecho, como se observa en los diferentes diagramas (panel C y D), la aplicación durante 1 minuto del agonista muscarínico produce un drástico incremento del número de eventos, pero recuperando la frecuencia de las mPSCs inmediatamente tras su lavado.

En un total de 11 células sometidas a este protocolo, el valor medio de la frecuencia en la situación control fue de $0,99 \pm 0,3$ Hz, incrementándose la misma hasta $1,87 \pm 0,5$ Hz en presencia de 100 μ M de MCho ($p < 0,01$, test t de Student). Sin embargo, este cambio en la frecuencia de las mPSCs no viene acompañado de una modificación de los parámetros biofísicos de las mismas (ver tabla 6).

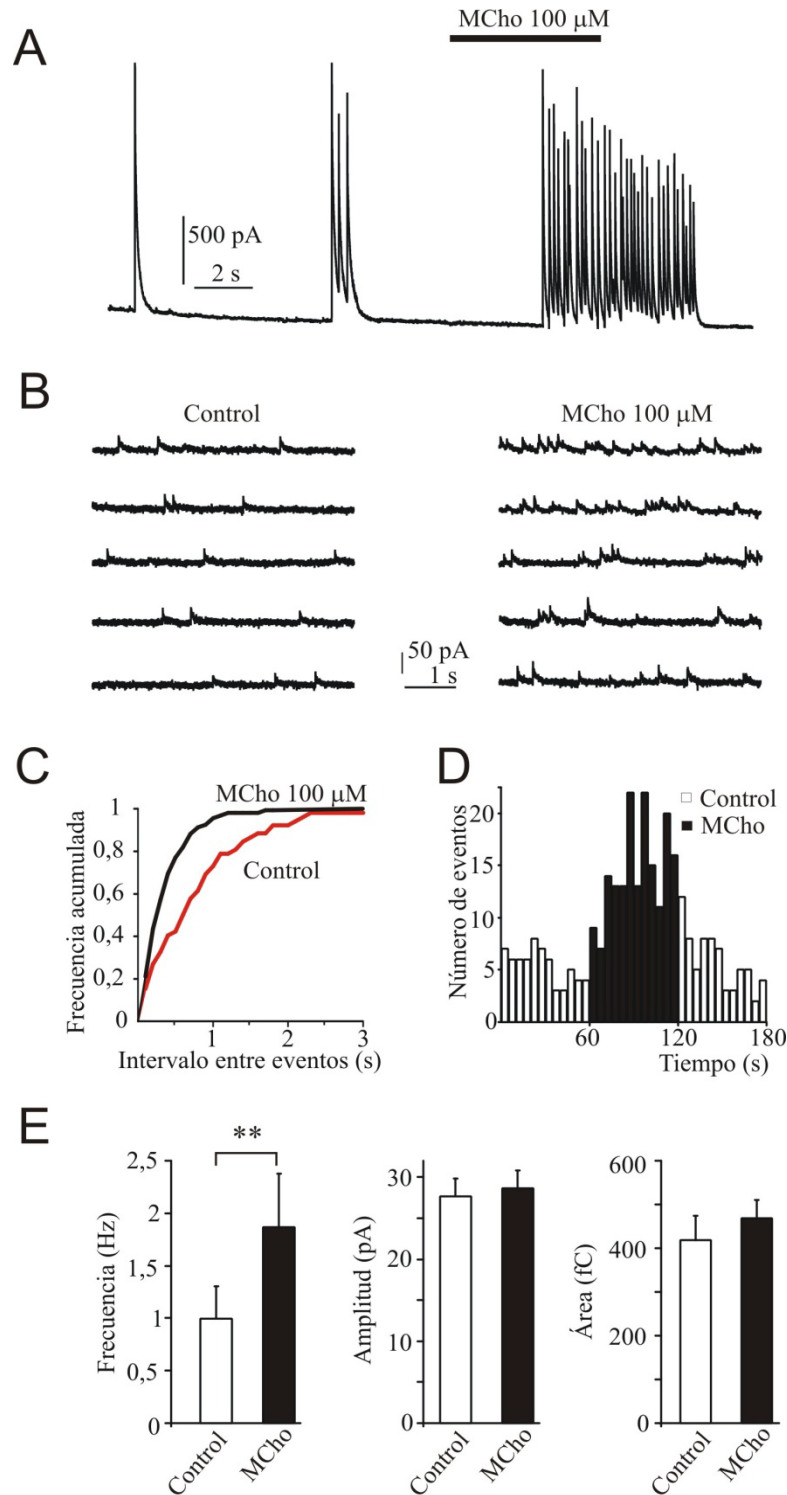


Figura 23. La frecuencia de las mPSCs fue incrementada por la acción de MChol. **A.** Registro original de una célula con el potencial de membrana fijado a 0 mV a la que se le aplica 5 s de MChol 100 μ M tal y como muestra la barra horizontal. **B.** Trazos secuenciales (de arriba abajo) de corrientes miniatura obtenidas en la misma célula que en el panel A. Las mPSCs son registradas en presencia de 1 μ M de TTX y la aplicación de MChol 100 μ M se efectuó durante 1 minuto. El lavado de MChol recuperó la actividad control. **C.** Gráfico de la frecuencia acumulada frente al intervalo entre eventos en la situación control y MChol. **D.** Representación en histograma del número de eventos cada 5 s. **E.** Diagrama de barras de los datos medios de la frecuencia, amplitud y área de las mPSCs en las dos condiciones experimentales. Los datos muestran la media \pm E.S.M. n:11. ** $p < 0,01$.

Tabla 6. Parámetros biofísicos de las mPSCs registradas en las diferentes condiciones experimentales

	Amplitud (mV)	Tiempo al pico (ms)	Declive (ms)	Área (fC)	Anchura media (ms)
Control	$27,7 \pm 2$	$1,79 \pm 0,2$	$31,1 \pm 1,4$	418 ± 61	$5,8 \pm 0,7$
Metacolina	$28,5 \pm 2$	$2,36 \pm 0,3$	$29,7 \pm 1,2$	468 ± 40	$6,9 \pm 1,3$

Los datos están representados como la media \pm E.S.M.

De igual manera quisimos evaluar la generación de mPSCs a potenciales de fijación de voltaje de -70 mV, tal y como habíamos realizado a potenciales de 0 mV. Teniendo en cuenta que en futuros experimentos modificaremos el V_m y que tanto la disolución extracelular como la intracelular serán diferentes (ver sección III) había que confirmar los datos anteriormente aportados.

En la figura 24 presentamos los datos obtenidos tras aplicar el mismo protocolo que en el caso de las mPSCs a 0 mV a 11 neuronas fijadas a -70 mV. La aplicación de MChol aumenta la frecuencia de los eventos estocásticos al igual que ocurría a V_m de 0 mV.

En el panel A mostramos una célula en la que la aplicación de MChol 100 μ M durante 5 s produce un aumento significativo de las mPSCs, tras una pequeña demora de 2 s. Generando una mPSC media en cada una de las condiciones experimentales observamos que la activación de los mAChRs no modifica ningún parámetro biofísico de los mismos (panel B; tabla 7).

Por otra parte la cuantificación de la frecuencia, en las 11 células de este grupo experimental, arroja un aumento de la misma desde $1,4 \pm 0,2$ Hz en la situación control hasta $4,1 \pm 0,7$ Hz tras la aplicación de MChol 100 μ M.

Tabla 7. Parámetros biofísicos de las mPSCs medias registradas en las diferentes condiciones experimentales a un V_m de -70 mV.

	Amplitud (mV)	Tiempo al pico (ms)	Declive (ms)	Área (fC)	Anchura media (ms)
Control	$29,1 \pm 1$	$1,68 \pm 0,1$	$11,5 \pm 0,5$	146 ± 10	$3,6 \pm 0,1$
Metacolina	$27,7 \pm 2$	$1,63 \pm 0,1$	$11,6 \pm 0,7$	140 ± 7	$3,9 \pm 0,1$

Los datos están representados como la media \pm E.S.M.

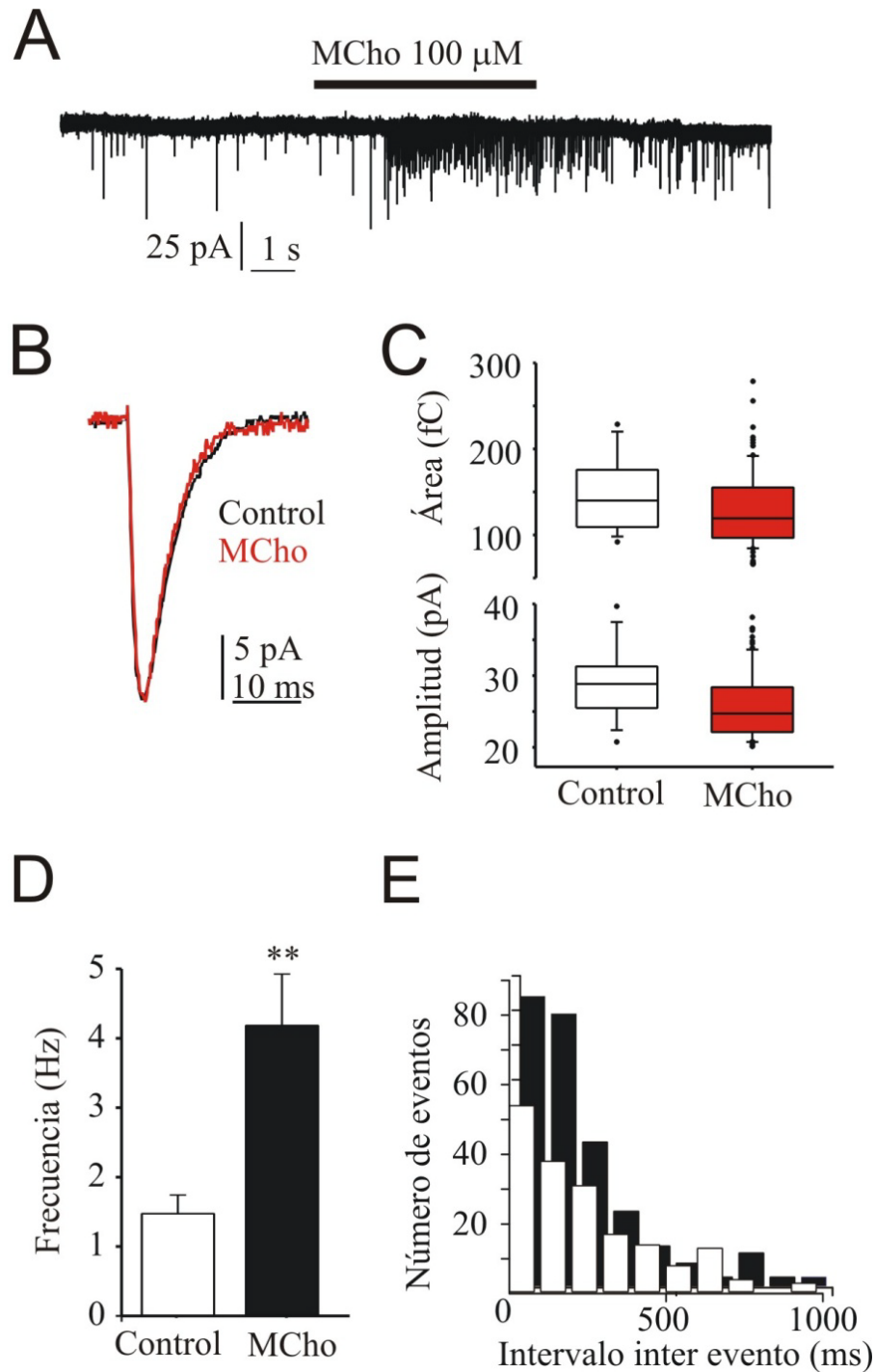


Figura 24. La frecuencia de las mPSCs está aumentada por la aplicación de MChol. **A.** Registro representativo de una célula perfundida con TTX 1 μ M y fijada a -70 mV. Se administra MChol 100 μ M tal y como indican las barras horizontales. **B.** Trazo medio de mPSC en las condiciones control y MChol. **C.** Diagrama de cajas del área y la amplitud de las mPSCs en las diferentes condiciones experimentales. En la caja se representan los cuartiles 25 y 75 separados por el valor de la mediana de la muestra poblacional, marcando los límites inferior y superior de la muestra. Los puntos representan los datos desviados de la media que no se incluyen en el análisis. **D.** Diagrama de barras de la frecuencia de eventos en la situación control y MChol. Los datos están representados como la media \pm E.S.M. de 11 células. ** $p < 0,01$ tras el test t de Student. **E.** Histograma que muestra el número de eventos de una célula modelo en la condición control (barras blancas) y MChol (barras negras) a 100 ms de intervalo.

7. MChol no afecta postsinápticamente a la cinética de las corrientes GABA_A.

Una vez descartado el efecto postsináptico mediado por receptores acoplados a proteínas G quisimos evaluar un posible efecto directo del agonista muscarínico MChol sobre el receptor GABA_A. En cultivos neuronales de baja densidad, fijamos el potencial de reposo a -70 mV y con la disolución intracelular que se utilizará en los experimentos de estimulación de fibra aislada caracterizada por tener una concentración de Cl⁻ de 130 mM, generamos corrientes de Cl⁻ (I_{GABA}) activadas por la aplicación de GABA exógeno 100 μM, en pulsos de 500 ms, a intervalos de 10 s.

El resumen de los experimentos lo mostramos en la figura 25. La aplicación de MChol 100 μM durante 180 s no alteró la amplitud de las I_{GABA} en las 19 células analizadas a un potencial de membrana de -70 mV ($9,04 \pm 0,5$ y $8,95 \pm 0,5$ nA en la situación control y MChol respectivamente). En el panel A mostramos el curso temporal de una célula representativa de la media con los trazos originales registrados insertos en la misma.

Aunque los resultados eran claros, quisimos asegurarnos que la aplicación de MChol no afectaba a los receptores postsinápticos GABA_A a ningún V_m por lo que realizamos en 11 células un estudio de la relación intensidad voltaje.

En el panel B representamos la media de las corrientes registradas desde potenciales de fijación de voltaje de -80 mV hasta valores de +40 mV. Como se puede observar, la aplicación de MChol no afectó a la amplitud de la corriente a ningún voltaje.

En resumen estos resultados claramente indican que los receptores muscarínicos no actúan postsinápticamente y sugiere una acción presináptica en el efecto descrito.

8. Papel de los receptores M1 en la potenciación de IPSCs ejercida por MChol.

Una vez determinado que el efecto de MChol, para la inducción de una salva de IPSCs, se produce a nivel presináptico, nos planteamos evaluar, con la farmacología existente para los mAChRs, qué subtipos de mAChRs están implicados en esta potenciación.

El mayor problema que nos encontramos en este aspecto, es la poca selectividad de la farmacología existente para los diferentes subtipos de mAChRs (ver tabla 2 en la sección I). A pesar de este inconveniente pudimos encontrar diferentes fármacos que nos

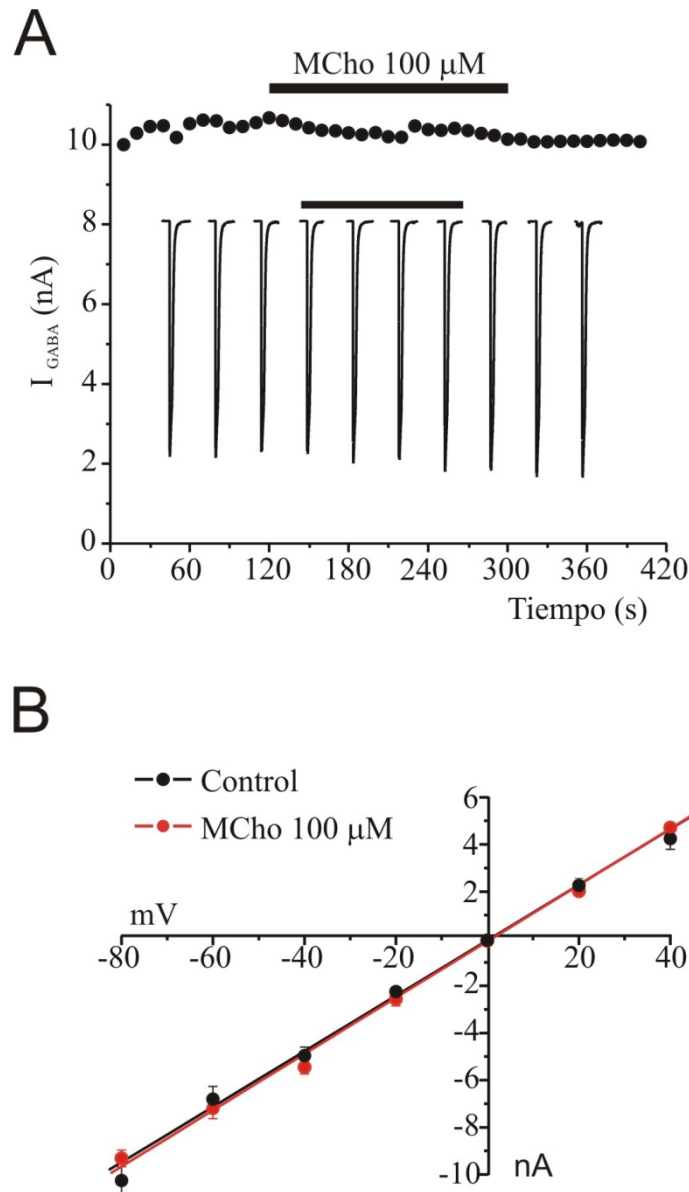


Figura 25. Efecto de la activación de los mAChRs sobre las corrientes de cloruro provocadas por la administración de GABA exógeno. **A.** Curso temporal de la corriente de cloruro generada en una célula representativa de la media (n:19) y sus trazos originales insertos. La generación de las I_{GABA} se produce por la aplicación exógena de pulsos de 500 ms de duración de una concentración de GABA de 100 μ M a intervalos de 10 s. La aplicación de MChol 100 μ M durante 3 minutos se realizó tal y como muestran las barras horizontales. **B.** Relación de la amplitud de corrientes frente al potencial de membrana fijado. Los diferentes puntos fueron ajustados a una regresión lineal (R^2 : 0,9975 y 0,9986 en la situación control y MChol respectivamente). n:11. Los datos se representan como la media \pm E.S.M.

podrían ayudar a evaluar este punto, puesto que a concentraciones concretas llegan a ser lo suficientemente selectivos. Usamos el único agonista selectivo para un subtipo de mAChRs, el McN-A-343 (30 μ M), agonista selectivo de los receptores M1 para ACh.

También usamos pirenzepina (1 μ M) como antagonista M1, himbacina (1 μ M) como antagonista M2 y M4 aunque tiene actividad antagonista M3 y 4-DAMP (1 μ M)

como antagonista M3, M4 y M5 principalmente aunque también tiene actividad como bloqueante de los M1.

Este complejo panorama farmacológico nos permitió elaborar diferentes protocolos para intentar dilucidar que subtipos de receptores están implicados en la potenciación de la transmisión GABAérgica en nuestra red neuronal.

En la figura 26 mostramos el papel que puede desempeñar el receptor M1 en esta potenciación. Usando el agonista McN-A-343 de los receptores M1 a una concentración de 30 μ M durante 20 s, se observó en 6 células que la activación de estos receptores no era suficiente para producir el aumento de las IPSCs ($0,2 \pm 0,1$ nC) que si se desataba con la aplicación de MCho 100 μ M durante 5 s antes ($1,85 \pm 0,3$ nC) y después de la aplicación de McN-A-343 ($1,20 \pm 0,4$ nC) ($p < 0,01$ evaluado por el test t de Student en ambos casos frente a la actividad basal).

En esta misma figura mostramos el efecto del antagonista M1 pirenzepina. Tras una primera aplicación de MCho 100 μ M durante 5 s y registrar la salva de IPSCs, se preadministró durante 15 s una disolución extracelular con una concentración de 1 μ M de pirenzepina, seguido de la coaplicación durante 5 s de esta disolución de pirenzepina con MCho 100 μ M, para retirar 5 s después la pirenzepina. Tras esta aplicación se repite la administración de 100 μ M de MCho durante 5 s. En el cómputo de 6 células vemos que el antagonista de los receptores M1 es incapaz de impedir el aumento de carga provocado por MCho ($1,6 \pm 0,3$; $1,3 \pm 0,2$; y $1,2 \pm 0,4$ nC en la situación control, en la coaplicación de MCho y pirenzepina y en el lavado).

En resumen, tras este grupo de experimentos mostrados en la figura 26, podemos decir que los receptores M1 no están implicados en el efecto potenciador de la transmisión GABAérgica inducido por el agonista muscarínico MCho ya que ni el agonista específico M1 es capaz de generar la salva de IPSCs, ni el antagonista es capaz de impedir que MCho ejerza su acción potenciadora de IPSCs.

9. Papel de los receptores M2-M5 en la potenciación ejercida por MCho.

Una vez descartado la implicación de los receptores M1, nos preguntamos si el resto de los mAChRs acoplados a una proteína $G_{q/11}$ (M3 y M5) participaban en la generación de la salva de corrientes postsinápticas GABAérgicas. Nos valimos del fármaco 4-DAMP para este estudio (1 μ M) ya que tiene actividad bloqueadora de todos

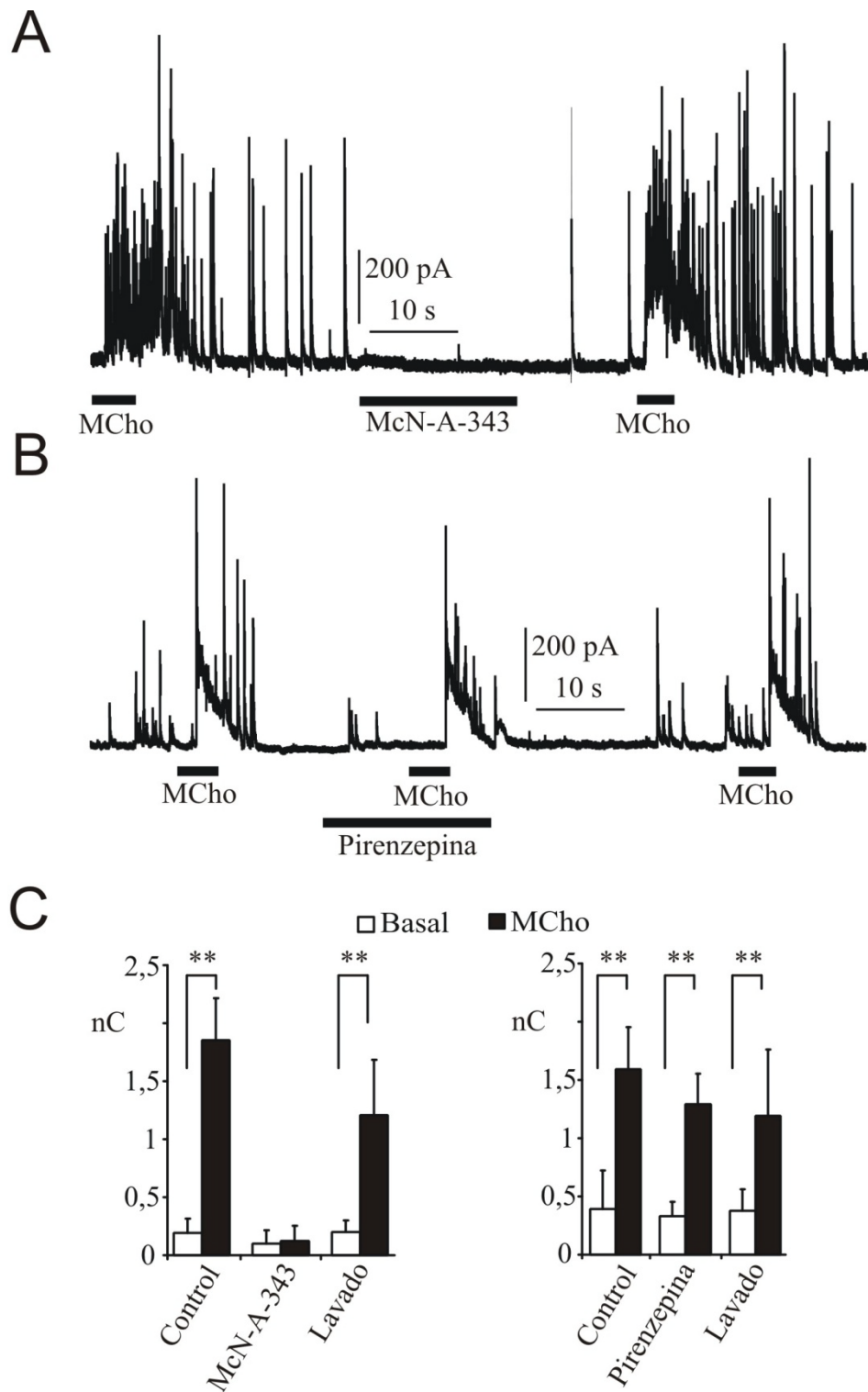


Figura 26. Implicación de los receptores M1 en la potenciación de la transmisión GABAérgica provocada por MChO. **A.** Registro representativo de una célula con el V_m en 0 mV a la que se aplica MChO (MChO 100 μ M) y el agonista selectivo M1 McN-A-343 (30 μ M) tal y como muestran las barras horizontales. **B.** Registro original de una célula a la que se ha aplicado el antagonista M1 pirenzepina (1 μ M) como indican las barras horizontales. La aplicación de MChO genera un aumento en el disparo de IPSCs en todas las ocasiones. **C.** Representación media de la carga (nC) generada por la aplicación de agonistas (barras negras) frente a la actividad basal (barras blancas). Datos expresados como media \pm E.S.M. n:6 en ambos protocolos. ** $p < 0,01$ (t de Student).

los subtipos de mAChRs de la familia M1. Como se puede observar en la figura 27, la aplicación de MCho 100 μ M previa preadministración durante 10 s de 4-DAMP a una concentración de 1 μ M no desencadena el efecto estudiado, aunque si lo consigue tanto en la aplicación control como tras el lavado del antagonista. En las 10 células sometidas a este protocolo observamos que la primera aplicación de MCho 100 μ M es capaz de elevar la carga analizada de la actividad basal ($0,58 \pm 0,1$ nC) hasta el cuádruple ($2,56 \pm 0,4$ nC) ($p < 0,01$ tras test t de Student). Sin embargo, la coaplicación de MCho junto con 4-DAMP no modifica significativamente la actividad basal ($0,45 \pm 0,2$ y $0,68 \pm 0,2$ nC para la condición basal y 4-DAMP respectivamente), recuperándose la actividad del agonista muscarínico tras el lavado del antagonista.

La valoración que hacemos de estos datos es que posiblemente estén implicados los receptores M3 y M5 en la modulación muscarínica de la transmisión GABAérgica, con un posible papel de las enzimas efectoras activadas por las subunidades $G_{q/11}$ como estudiaremos más adelante.

Finalmente, exploramos el posible papel de la familia de receptores M2 (M2 y M4) en la potenciación de la transmisión inhibitoria hipocampal con la herramienta farmacológica seleccionada para este propósito. La himbacina a una concentración de 1 μ M tiene capacidad para bloquear tanto los receptores M2 como los M4, aunque sus características químicas le confiere también un carácter inhibitorio para los receptores M3, pero con una afinidad menor por ellos. En las 8 células investigadas con este fin (figura 28), la aplicación de himbacina 1 μ M, con el mismo protocolo de preaplicación usado en este apartado, impidió la generación de una salva de IPSCs provocadas por MCho. Cuantitativamente, la primera aplicación de MCho 100 μ M durante 5 s elevó la carga analizada durante 16 s desde los $0,49 \pm 0,2$ nC basales a $1,90 \pm 0,3$ nC ($p < 0,01$ tras test t de Student). Lo mismo sucedió tras exponer la red neuronal al agonista muscarínico después de realizar el test con himbacina y una vez retirado éste del circuito ($0,63 \pm 0,2$ y $2,34 \pm 0,4$ nC en la situación basal y agonista respectivamente ($p < 0,01$, t de Student). La coadministración del agonista junto con el antagonista ($0,57 \pm 0,22$ nC) no modificó significativamente la actividad basal ($0,42 \pm 0,18$ nC).

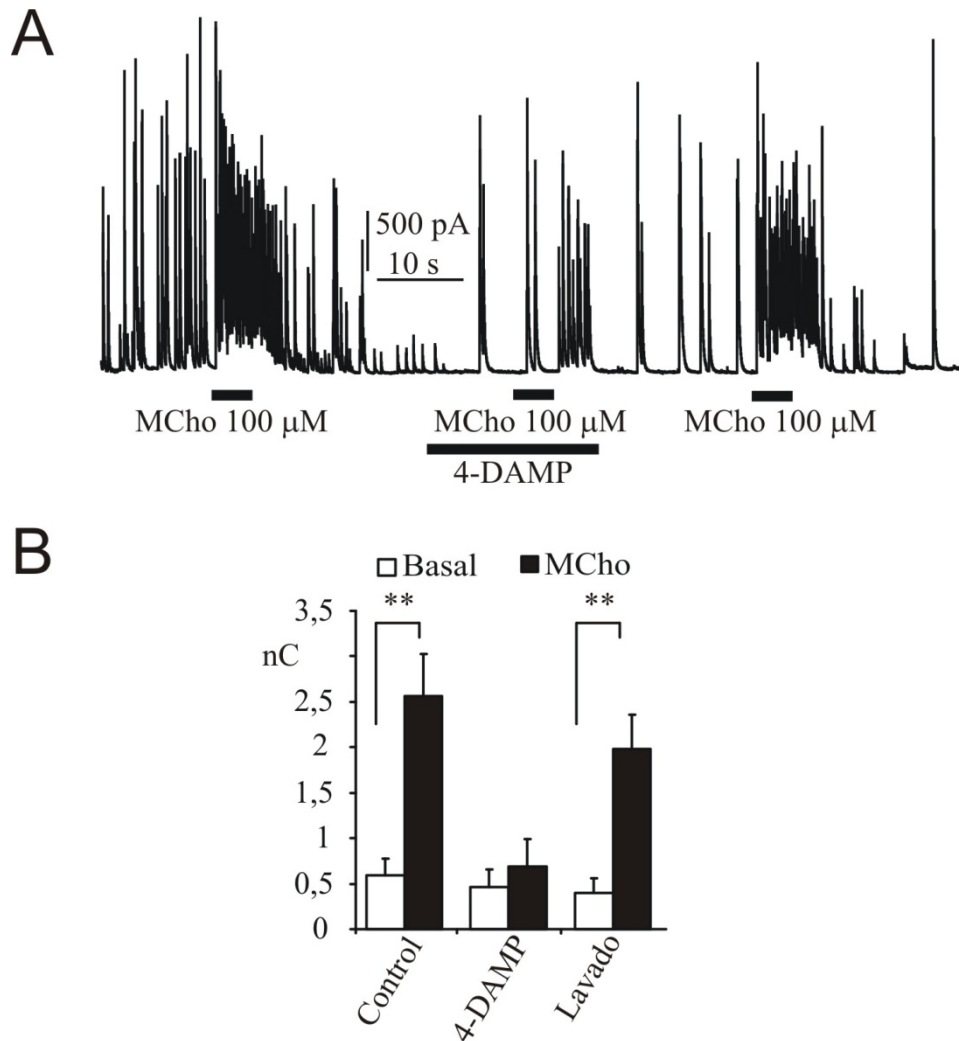


Figura 27. El antagonista 4-DAMP (1 μ M) bloquea completamente el efecto de MChR 100 μ M. **A.** Registro original de una célula a la que se administró MChR 100 μ M y 4-DAMP (1 μ M) antagonista de los mAChRs M3 y M5, tal y como indican las barras horizontales. **B.** Representación media de la carga provocada por MChR (barras negras) comparada con la carga de la actividad basal (barras blancas). Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. n: 10. **p < 0,01; t de Student.

Resumiendo los datos aquí presentados, en cuanto a la implicación de los diferentes subtipos de mAChRs en la modulación de la transmisión GABAérgica, podemos aseverar que los receptores M1 no están influyendo en la generación de la salva de IPSCs. Por otro lado sólo podemos indicar que tanto los receptores de la familia M2 (M2 y M4), como los de la familia M1 (M3 y M5), están implicados en la modulación de la señal ejercida por la aplicación de MChR 100 μ M y por tanto, sus respectivos mecanismos efectores tienen que ser los que estén desencadenando esta respuesta.

A continuación evaluaremos estos mecanismos efectores.

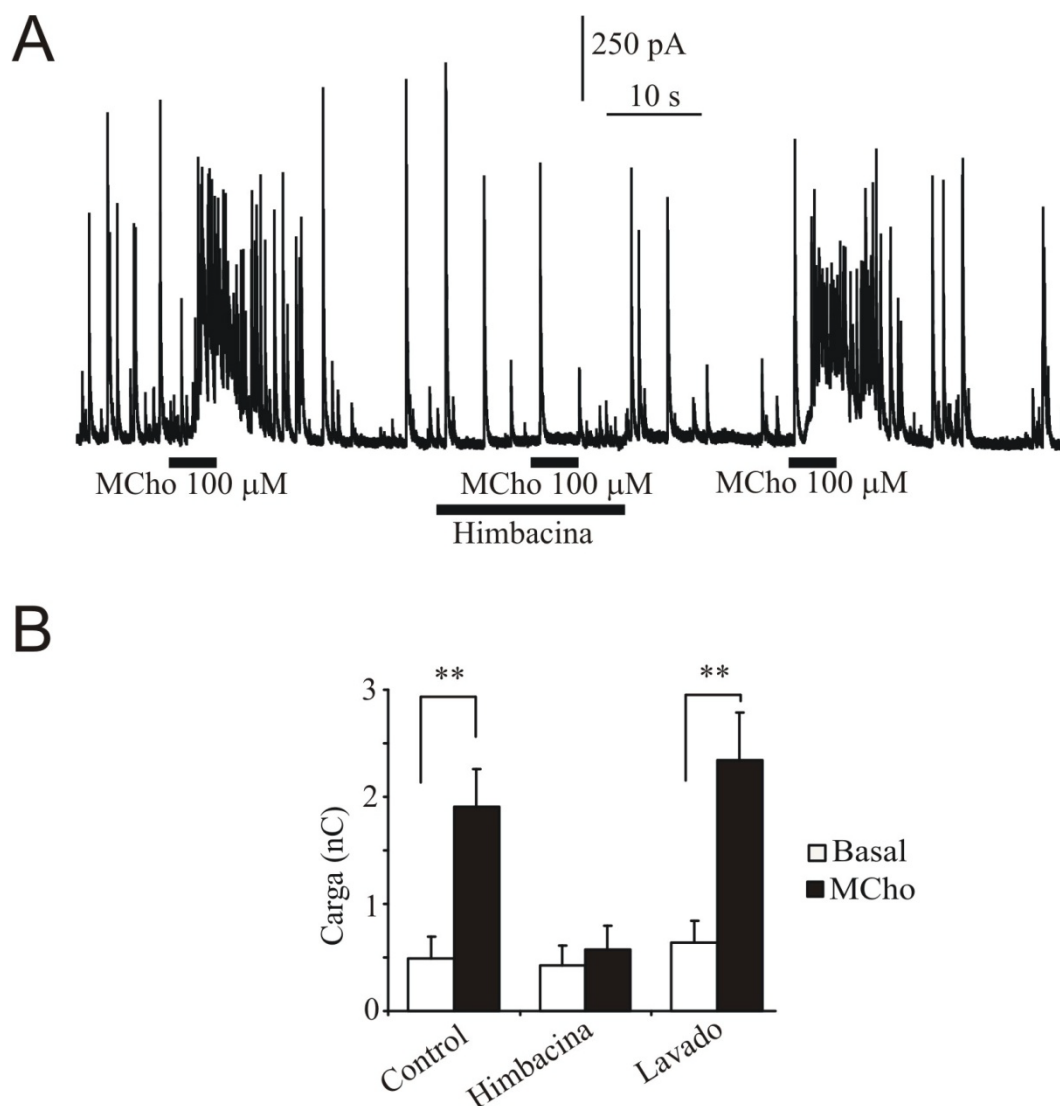


Figura 28. El bloqueo de los receptores de la familia M2 suprime el aumento en las IPSCs inducido por MChol. **A.** Registro de una célula representativa de la media a la que se le aplica el agonista muscarínico MChol 100 μ M y el antagonista de los receptores M2, M4 himbacina (1 μ M), con el protocolo indicado por las barras horizontales. **B.** Estudio cuantitativo en 8 células de la carga (nC) generada por la aplicación de MChol comparada con la actividad espontánea basal. Media \pm E.S.M. ** $p < 0,01$; test t de Student.

10. Implicación de la ruta fosfolipasa C / IP₃ en el aumento de las IPSCs inducido por MChol.

La activación de los mAChRs de la familia M1 conlleva la producción de segundos mensajeros por la activación de la fosfolipasa C (PLC) y finaliza con un aumento de la concentración de Ca²⁺ citosólico (ver sección I).

Puesto que farmacológicamente el bloqueo de los receptores M3 y M5 por el antagonista 4-DAMP impide la generación de la salva de corrientes originada por MChol, decidimos bloquear el complejo enzimático activado por las subunidad G_{q/11}, la PLC.

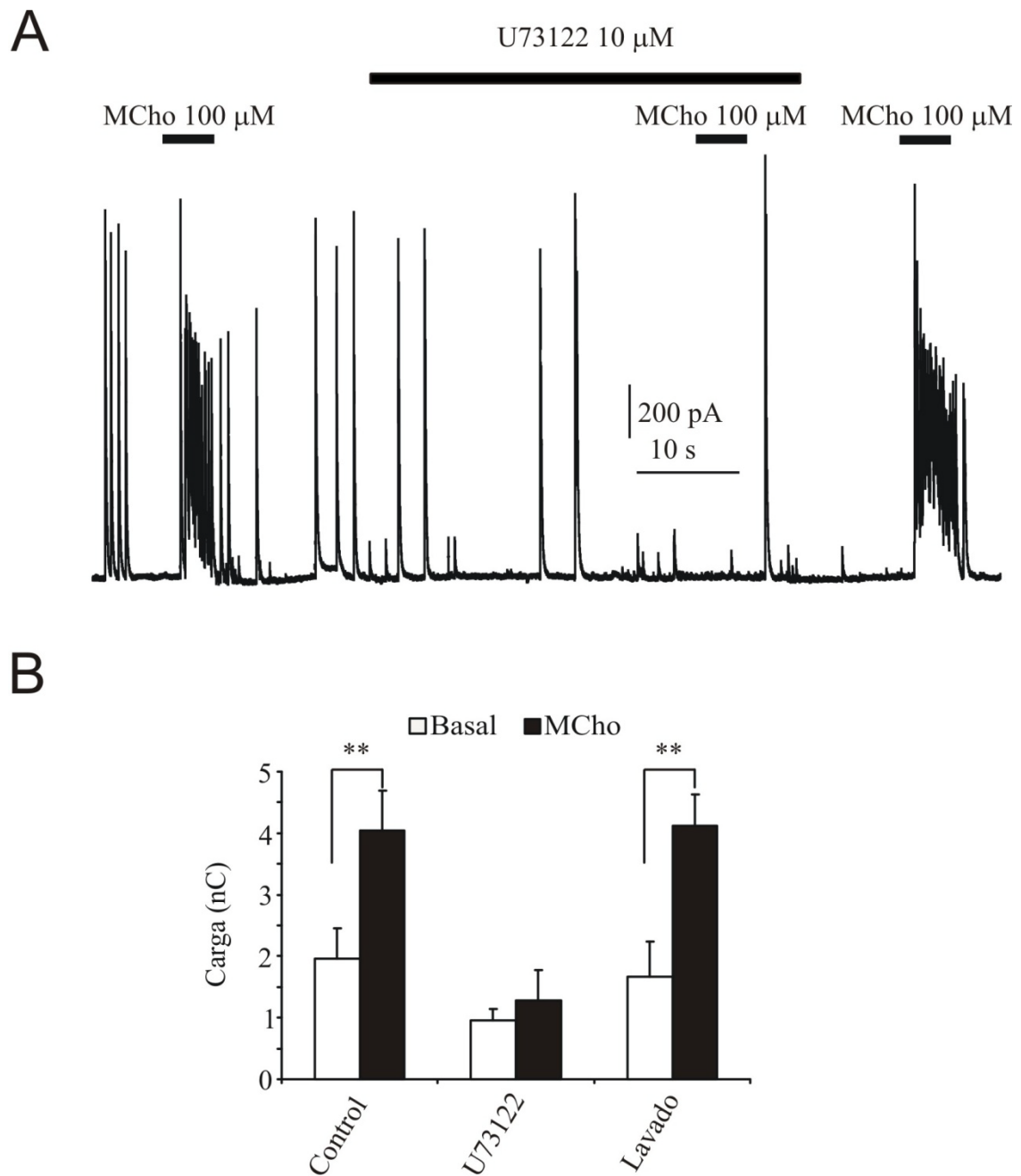


Figura 29. La inhibición de la actividad de la PLC impide el aumento de las IPSCs inducido por MChol. **A.** Registro de una célula fijada a 0 mV a la que se le aplica 5 s de MChol 100 μ M en tres momentos, uno de ellos tras 30 s de preadministración del inhibidor de la fosfolipasa C U73122 (10 μ M). **B.** Carga media medida durante la actividad basal (barras blancas) y tras la aplicación de MChol (barras negras) en las diferentes condiciones experimentales indicadas en la gráfica. Datos mostrados como la media \pm E.S.M. n:12. **p < 0,01; t de Student.

Para evaluar esta hipótesis usamos el fármaco U73122 (10 μ M), un bloqueante de la actividad enzimática PLC. Su acción se produce impidiendo la unión de la subunidad α G_q a la PLC por lo que impide la ruptura del PIP_2 anclado a membrana y por consiguiente, inhibe la producción de los segundos mensajeros DAG e IP_3 , es decir, impide la activación de PKC y el aumento de Ca^{2+} citosólico (Thompson y col., 1991).

Como se puede ver en la figura 30, el uso de U73122 (10 μ M) no modifica la actividad basal de la célula estudiada y tras 30 segundos de preaplicación es capaz de impedir la generación de una salva de corrientes GABAérgicas al dar un pulso de 5 s de MChol 100 μ M ($0,95 \pm 0,2$ y $1,3 \pm 0,5$ nC en condiciones basales y tras la coaplicación de U73122 y MChol respectivamente). La potenciación ejercida por MChol previamente registrada antes de la aplicación del inhibidor de la PLC es completamente recuperada tras retirar el mismo del sistema, siendo capaz de elevar la carga basal ($1,6 \pm 0,6$ nC) hasta $4,1 \pm 0,5$ nC ($p < 0,01$, test t de Student).

Estos datos obtenidos en 12 células sugieren que el efecto observado por la aplicación de MChol en nuestro sistema depende de la actividad de la PLC. Pero no resuelven si el efecto observado depende de la actividad PKC modulada por los niveles de DAG o si es dependiente de los niveles de IP₃, segundos mensajeros de la enzima PLC.

Para evaluar si los niveles de Ca²⁺ citosólico están implicados en este proceso, usamos la molécula 2-APB, bloqueante específico de los receptores IP₃ del retículo endoplasmático (Maruyama y col., 1997).

Un total de 24 células fueron sometidas a estudio en este apartado. Usamos una concentración de 10 μ M del bloqueante 2-APB para intentar evaluar el papel de los receptores IP₃ en el efecto mediado por MChol. Puesto que esta molécula debía internalizarse y llegar hasta el retículo endoplasmático para ejercer su efecto, dictamos que al menos tendríamos que aplicar durante 60 s este compuesto, para asegurarnos que estaría en condiciones de ejercer su bloqueo.

Como en protocolos anteriores iniciamos el estudio con una aplicación de 5 s de MChol 100 μ M para comprobar la sensibilidad de la red al agonista muscarínico, elevando la actividad basal ($0,5 \pm 0,1$ nC) cuatro veces ($2,1 \pm 0,3$ nC; $p < 0,01$, t de Student). En el panel A de la figura 29, observamos que la aplicación de 2-APB no modifica la actividad basal y consigue bloquear el efecto de la aplicación de MChol. Sin embargo, en 10 de las 24 células estudiadas la aplicación de 2-APB a una concentración de 10 μ M produjo un incremento de la actividad basal tras un periodo de latencia de unos 10 s (ver panel B). Esta actividad fue paulatinamente disminuyendo hasta volver a condiciones basales y siguió bloqueando la generación de una salva de corrientes con la aplicación de MChol.

Dado que al final se recuperaba la señal basal decidimos agrupar las 24 células ($0,7 \pm 0,1$ y $0,5 \pm 0,1$ nC en condiciones 2-APB y 2-APB + MChol, respectivamente).

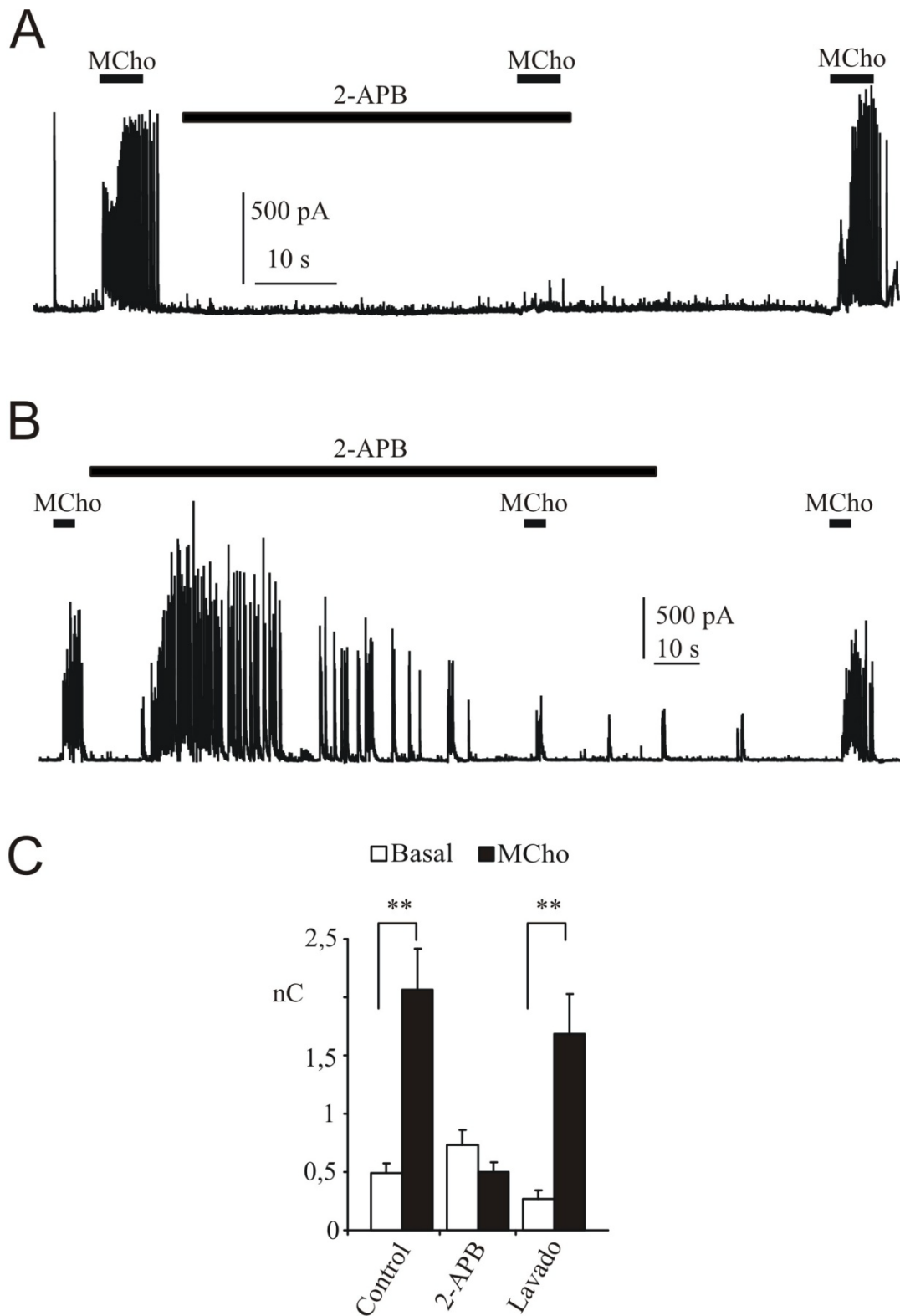


Figura 30. Efecto del bloqueo de los receptores IP_3 sobre las corrientes postsinápticas generadas por MCh. **A. B.** Trazos originales de células fijadas a 0 mV donde se aplican los fármacos tal y como muestran las barras horizontales (MCh 100 μ M; 2-APB 10 μ M). Trazo A no tiene respuesta a 2-APB. Trazo B con modificación de la actividad basal por la aplicación de 2-APB. **C.** Diagrama de barras de la media \pm E.S.M. de 24 células donde se analiza la carga previa (barras blancas) y posterior a la aplicación de MCh, en cada una de las condiciones indicadas. ** $p < 0,01$ t de Student.

11. MChO deprime la funcionalidad de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Los datos anteriormente mostrados muestran el papel determinante de la concentración de Ca^{2+} citosólica para la generación de la salva de corrientes GABAérgicas. En este punto nos encontramos con una pregunta nueva ya que hasta el momento, habíamos demostrado un efecto presináptico de los agonistas colinérgicos y farmacológicamente habíamos destacado el papel de los receptores M3 y M5, desencadenantes de un aumento del Ca^{2+} citosólico por un aumento en los niveles de IP_3 ; pero también habíamos detectado una importancia vital de la familia de receptores M2 mediante el uso de himbacina.

Como hemos reseñado en la sección I, la familia de los mAChRs de tipo M2 ejerce su efecto a través de una proteína $G_{i/o}$. Esta familia de receptores se caracteriza, de forma general, por inhibir la actividad de una adenilato ciclasa, disminuyendo por tanto los niveles de AMP_c citosólico. Pero también se caracteriza por modular corrientes iónicas (Hanoune y Defer, 2001). Es aquí donde pensamos que las corrientes de calcio dependientes de voltaje (CCDV) podían estar siendo moduladas por MChO.

Para aislar las corrientes de Ca^{2+} en las neuronas de hipocampo en cultivo, la célula a estudio se dializó con una disolución intracelular que contenía Cs^+ y TEA^+ para bloquear los canales de K^+ (ver en detalle en la sección III) y se superfundió con una disolución Tyrode que contenía TTX para bloquear las corrientes de Na^+ . Para facilitar el estudio de las corrientes se elevó la concentración de Ca^{2+} extracelular a 10 mM y se fijó el potencial de membrana a -70 mV. Para generar las corrientes de Ca^{2+} en la célula fijada se aplicó un pulso cuadrado de corriente despolarizante para elevar el potencial de membrana hasta +10 mV durante 50 ms. Este pulso se repitió a intervalos de 10 s.

En el panel A de la figura 31 mostramos un curso temporal medio de 8 células sometidas a un pulso cuadrado despolarizante, a las que se aplicó durante 100 s una concentración de MChO de 100 μM . La corriente de Ca^{2+} somática (I_{Ca}) media de estas células fue de $2,8 \pm 0,2$ nA y tras la aplicación de MChO se produjo una disminución de la misma del $55,7 \pm 5,1\%$ quedando la I_{Ca} de estas células en $1,35 \pm 0,1$ nA. La corriente inicial fue parcialmente recuperada tras el lavado del agonista muscarínico. En la figura mostramos los valores de corriente normalizados al pico máximo de corriente ($I_{\text{Ca}}/I_{\text{Ca}}$ máxima) para permitir una mejor comparación de los resultados y observamos que ya a los 60 s de exposición a MChO, se alcanzaba el máximo efecto de bloqueo. En el panel B

mostramos unos trazos originales, extraídos de una célula representativa de la media, en la que se puede observar que tras el tratamiento con MCho existe un cambio en la cinética de estas corrientes. Concretamente medimos la velocidad de inactivación ($\tau_{\text{inactivación}}$) de la corriente generada por la despolarización a +10 mV y los datos resultantes fueron que la $\tau_{\text{inactivación}}$ en la condición MCho disminuyó desde $14,86 \pm 0,2$ ms hasta $8,68 \pm 0,1$ ms.

En el panel C mostramos un curso temporal medio de 7 células sometidas al mismo protocolo que en el panel A. En este caso el periodo de administración de MCho 100 μM lo disminuimos a 60 s puesto que, como ha quedado demostrado, es tiempo suficiente para alcanzar el grado de bloqueo máximo. A este grupo de células se le añadió en la disolución extracelular una concentración de 1 μM de atropina, bloqueante de los mAChRs. La introducción del antagonista de los mAChRs no varió las corrientes control generadas por el pulso cuadrado de corriente y bloqueó por completo el efecto de la MCho sobre la I_{Ca} . Con este dato demostramos que el efecto de MCho sobre la I_{Ca} está mediado por activación de los mAChRs, excluyendo la posibilidad de una acción directa sobre los CCDV.

Los datos hasta ahora mostrados hablan de un bloqueo por activación muscarínica de la I_{Ca} a un voltaje fijo (+10 mV), pero el rango de apertura de los CCDV es más amplio y el estudio de un mayor espectro de voltajes nos puede dar una visión más concreta del subtipo de canales de Ca^{2+} bloqueados por MCho. El uso de rampas de voltaje nos permite realizar un estudio mucho más detallado de la relación intensidad/voltaje, desde aperturas de corrientes a -40 mV hasta el potencial de reversión del ion Ca^{2+} en estas condiciones ($\approx +60$ mV).

En el panel D mostramos una célula representativa de la media de las 5 células sometidas a este protocolo. Aquí observamos que las células presentan una apertura de los canales de Ca^{2+} a un voltaje aproximado de -20 mV, alcanzan una I_{Ca} máxima alrededor de los +10 mV y que el potencial de reversión del Ca^{2+} en estas condiciones es sobre los +60 mV. Al aplicar una concentración de MCho 100 μM observamos que se produce un desplazamiento de la curva de corriente de unos 10 mV a la izquierda a los 10 s de activar los mAChRs y que a los 60 s se produce un bloqueo de la corriente a todos los potenciales evaluados pero principalmente a los más despolarizantes. También realizamos este protocolo experimental en presencia de atropina en 4 células observando un bloqueo absoluto del efecto de MCho.

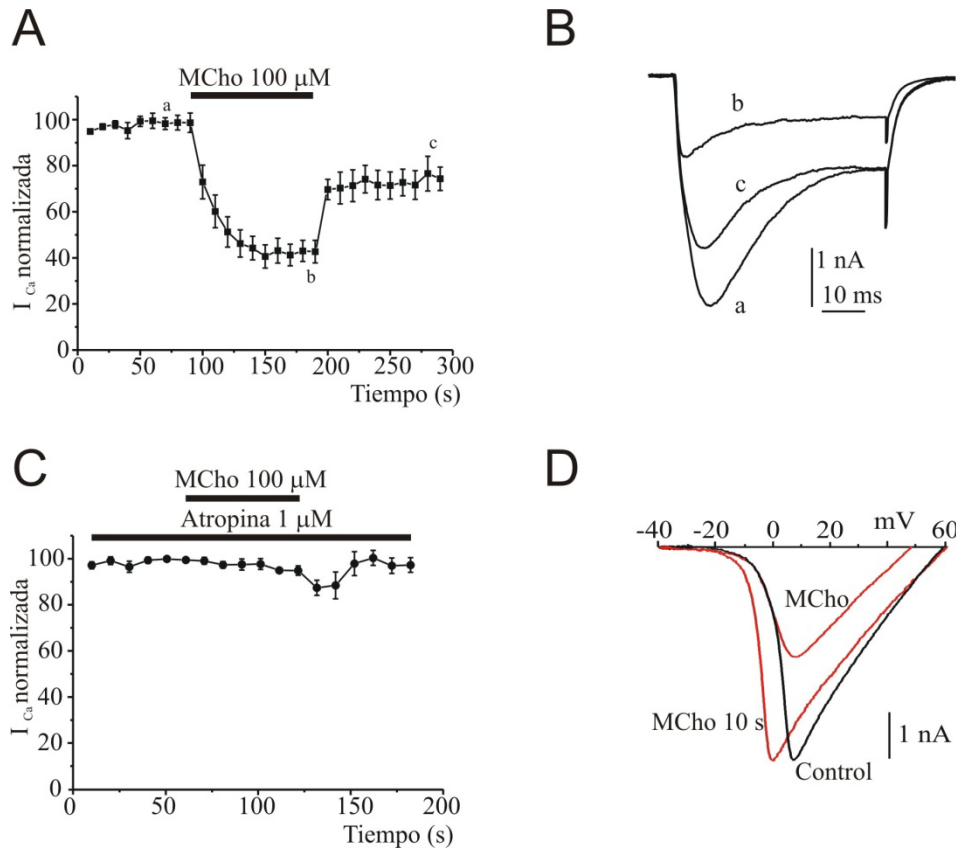


Figura 31. Bloqueo de MChR sobre los CCDV. **A.** Curso temporal de la corriente de Ca^{2+} generada por un pulso cuadrado de 50 ms a +10 mV en 8 células fijadas a -70 mV. La amplitud máxima de cada célula fue usada para normalizar al 100% cada curso temporal. **B.** Trazos originales de corrientes de Ca^{2+} obtenidas de una célula sometida al protocolo del panel A. **a** situación control; **b** tras MChR 100 μ M; **c** lavado. **C.** El mismo protocolo mostrado en A pero en presencia de atropina 1 μ M. n:7. **D.** I_{Ca} generadas por rampas de corrientes de 100 ms hasta +60 mV en células fijadas a -70 mV. La relación intensidad/voltaje se muestra en condiciones control, a los 10 s de aplicar MChR 100 μ M y a los 60 s de la aplicación del agonista.

El hecho de que en las rampas de voltaje observáramos un mayor bloqueo en los potenciales más despolarizantes, nos puso en sobre aviso que quizás el efecto de MChR fuese sobre un subtipo específico de CCDV. Para evaluar esta posibilidad nos valimos de las herramientas farmacológicas existentes para la disección de los diferentes subtipos de CCDV de alto umbral. Por tanto usamos una dihidropiridina, nifedipino 3 μ M, para bloquear los canales de tipo-L; con ω -conotoxina GVIA 1 μ M, una toxina extraída del caracol marino *Conus geographus*, conseguimos anular las corrientes de tipo-N y con 2 μ M de ω -agatoxina IVA, componente del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*, impedimos la I_{Ca} de los canales de Ca^{2+} de tipo-P/Q (García y col., 2006). Como por definición los receptores de tipo-R son resistentes a toda la farmacología existente para los CCDV, para su aislamiento se usó un coctel con todas las moléculas y se tuvo en cuenta este resultado para restarlo a la hora de realizar los cálculos en el resto de I_{Ca} .

Usando el mismo protocolo que en el caso del panel A, procedimos al aislamiento farmacológico de cada uno de los subtipos de canales de Ca^{2+} de alto umbral y procedimos a la aplicación de MCho 100 μM (figura 32) para evaluar su efecto sobre esta corriente específica. La contribución de los diferentes subtipos de canales de Ca^{2+} en la I_{Ca} total de la célula fue de un 22% para el tipo-N (n:7), un 12% para el tipo P/Q (n:7), un 44% para el tipo-L (n:7) y un 21% de una corriente residual resistente a bloqueantes atribuida al tipo-R (n:5). Como mostramos en el diagrama de barras resumen del panel E, la sensibilidad a MCho de cada uno de los subtipos de canales de Ca^{2+} fue diferente. Así, la presencia de 100 μM de MCho apenas modificó la corriente de Ca^{2+} de tipo-L ($3,2 \pm 5\%$ de bloqueo por 3 μM de nifedipino) y de tipo-R ($12,6 \pm 2\%$ de bloqueo de las corrientes resistentes). Sin embargo, tal y como adelantaba el estudio de rampas, puesto que son los canales de Ca^{2+} mayoritarios a voltajes más despolarizantes, el bloqueo de las corrientes de tipo-N y -P/Q fue mucho mayor ($33,5 \pm 7\%$ y $44,7 \pm 3\%$, respectivamente).

A la vista de estos resultados decidimos seguir investigando en el efecto sobre los niveles de Ca^{2+} de la activación muscarínica. Nos podemos hacer una idea de qué subtipos de receptores muscarínicos están implicados y cómo afecta la activación de los mAChRs a la actividad global de nuestra red neuronal, pero cómo actúa a nivel de una sola célula y cuál es la importancia fisiológica de la activación de este tipo de receptores metabotrópicos, son preguntas que nos planteamos responder.

12. MCho actúa selectivamente sobre autapsis GABAérgicas.

Hasta el momento los datos mostrados provienen de cultivos en los que las neuronas de hipocampo de rata realizan contactos múltiples con las neuronas vecinas, formando una red o entramado de señales excitadoras y/o inhibitoras. El efecto observado del agonista muscarínico MCho ha sido sobre esta red, valorando la sumación de señales sobre la célula postsináptica registrada. No obstante, hemos demostrado que el efecto es presináptico pero tenemos pocos detalles de cómo actúa sobre una única célula. Por lo tanto, nos planteamos demostrar cómo afecta la aplicación del agonista muscarínico sobre la presinápsis a nivel de la neurotransmisión, ya que hemos demostrado que la activación de las proteínas G unidas a los receptores muscarínicos aumentan por un lado el Ca^{2+} citosólico vía PLC/IP₃ y sin embargo bloquean los CCDV de alto umbral, principalmente aquellos más implicados en la neurotransmisión.

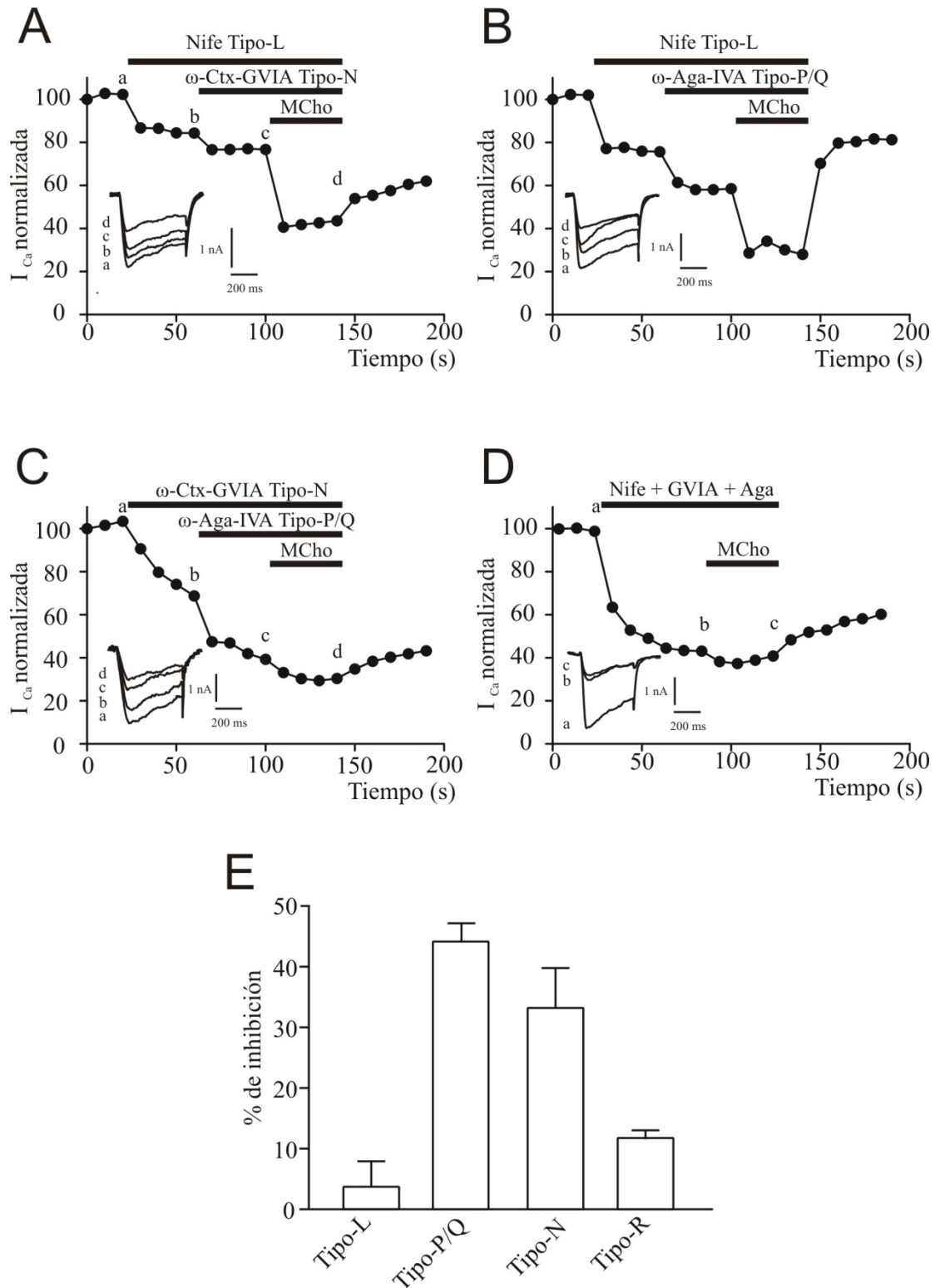


Figura 32. Bloqueo selectivo de los CCDV por MChol. **A.** Curso temporal de la corriente de Ca^{2+} generada por un pulso cuadrado de 50 ms a +10 mV en una célula fijada a -70 mV a la que se le aplica de forma sumatoria 3 μ M de nifedipino, 1 μ M de ω -conotoxina GVIA y 100 μ M de MChol. La amplitud máxima de cada célula fue usada para normalizar al 100% cada curso temporal. Insertos se observan los trazos originales de la célula representada. **B.** Mismo protocolo que en A pero en presencia de ω -agatoxina IVA 1 μ M. **C. D.** Igual con las toxinas indicadas en la barra horizontal. **E.** Inhibición media ejercida por MChol en cada uno de los subtipos de CCDV. Los datos se muestran como la media \pm E.S.M. (n: 6-12).

Por lo tanto, afrontamos un nuevo bloque de resultados en los que se persigue evaluar, de un modo más fisiológico, el papel de los receptores muscarínicos en la transmisión sináptica. El principal problema metodológico con el que nos encontramos es cómo estimular una sola célula del sistema. Esto lo conseguimos por dos vías: la estimulación eléctrica de una fibra aislada que contacte con la célula registrada (ver más adelante); y la obtención de cultivos de autapsis.

Una autapsis es una célula que establece sinapsis consigo misma, lo que permite que con un mismo electrodo podamos estimular la liberación presináptica del neurotransmisor específico de la célula a estudio y registrar la respuesta postsináptica.

Esta aproximación metodológica nos permite, además, discriminar entre células glutamatérgicas y células GABAérgicas, ya que las podemos diferenciar por la cinética de las señales registradas y corroborar esta observación, farmacológicamente, añadiendo antagonistas glutamatérgicos o GABAérgicos al finalizar el experimento.

En un primer grupo de células realizamos el estudio del efecto de la aplicación de MChO 100 μ M en la generación de corrientes en células glutamatérgicas (figura 32). Para conseguir que la autapsis libere neurotransmisor sobre si misma aplicamos un pulso de 0,5 ms a +40 mV (V_m de -70 mV) que abre los canales de Na^+ dependientes de voltaje y por tanto despolariza la célula con la consiguiente apertura de canales de Ca^{2+} .

Las características de la disolución intracelular (ver sección III) permite este proceso que libera, en el caso de las células a estudio en la figura 33, glutamato. Aplicamos en el caso de las células glutamatérgicas un doble pulso, con un retraso entre el primer estímulo y el segundo de 50 ms, que nos permite estudiar simultáneamente la corriente generada por el primer pulso y la probabilidad de liberación de neurotransmisor en la célula estudiada o la velocidad de reciclado vesicular (mediante el cálculo de la relación entre la señal registrada en el segundo estímulo y el primero; PPR E2/E1). Este protocolo lo repetimos a intervalos de 10 s (0.1 Hz).

Al estimular una autapsis, lo primero que se registra es una corriente de Na^+ dependiente de voltaje provocada por la aplicación del pulso cuadrado y superpuesta a esta corriente observamos la corriente generada por la apertura de canales dependientes de ligando. Esta corriente de Na^+ ha sido eliminada en los registros mostrados así como el artefacto capacitativo de la estimulación.

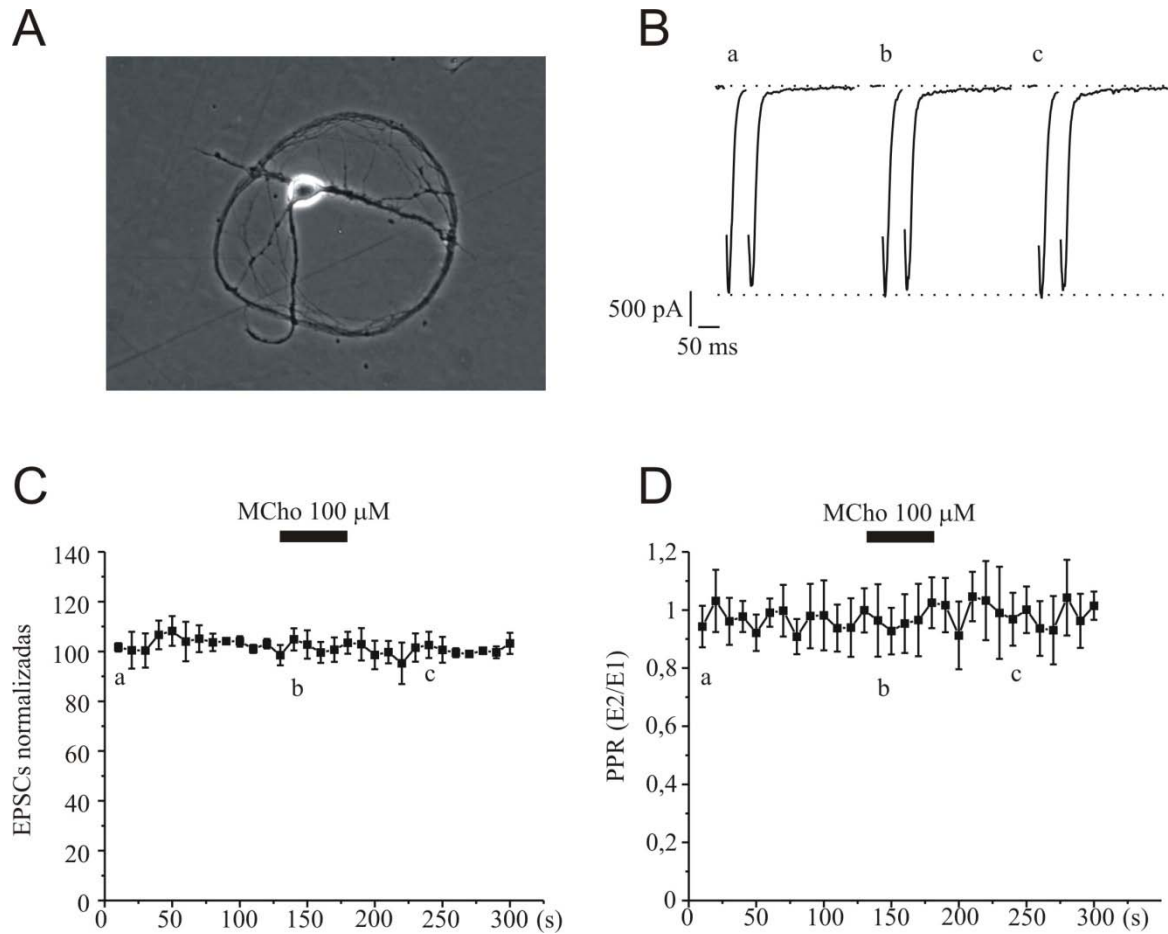


Figura 33. *MChol no modifica las corrientes generadas en autapsis glutamatergicas.* **A.** Imagen tomada a una autapsis glutamatergica. **B.** Registro representativo de las EPSCs en respuesta a un doble estímulo, separado 50 ms, en una célula cuyo potencial de membrana está fijado a -70 mV. Los registros muestran una respuesta en situación control (a), tras la aplicación de MChol 100 μ M (b) y después del lavado del agonista (c) tal y como se observa en los paneles C y D. **C.** Curso temporal medio de la amplitud del primer estímulo aplicado. MChol 100 μ M aplicada según muestra la barra horizontal. **D.** Representación temporal de la relación de pares de pulsos en la misma condición que en el panel C (E2/E1). Datos representados como media \pm E.S.M. n: 6.

Como se puede observar en el panel B de la figura 33, las corrientes glutamatergicas son amplias y se cierran rápidamente. El segundo pulso, aplicado 50 ms después del primero, muestra unas características similares que vienen definidas por el carácter glutamatergico de las mismas ($PPR \approx 1$).

La aplicación de una concentración de MChol 100 μ M durante 60 s no modifica ni la corriente generada por el primer pulso (panel C) ni la PPR como se observa en el panel D, en un total de 6 autapsis glutamatergicas sometidas a este protocolo.

En el siguiente grupo de experimentos, mostramos un protocolo muy parecido al anterior, pero esta vez el estudio se centra en autapsis de naturaleza GABAérgica. La cinética de las corrientes generadas en las 8 autapsis representadas en la figura 34,

muestra una deactivación mucho más lenta que en el caso de las autapsis glutamatérgicas. Debido a esta característica propia de las corrientes GABAérgicas, el segundo pulso generado para poder realizar el estudio de la PPR se efectuó a los 100 ms, en lugar de a los 50 ms propio de corrientes de glutamato.

Al igual que en la figura 33, en la figura 34 mostramos en el panel A una imagen captada de una autapsis donde se puede comprobar la conectividad sobre si misma de la célula. En el panel B, mostramos los trazos característicos de la generación de un par de pulsos de corriente en una autapsis GABAérgica, a los que se les ha sometido a diferentes condiciones experimentales. El primer trazo corresponde a la situación control y muestra una disminución en la amplitud del segundo pulso. Esta situación es propia de las sinapsis GABAérgicas donde, por su alta probabilidad de liberación, prima la disminución de vesículas por encima de la acumulación de Ca^{2+} residual (ver sección V). Esto se refleja en la relación de pares de pulsos ($\text{PPR} < 1$). También observamos los pulsos generados en la situación MCho y en el lavado.

Como se puede observar en el panel C, la aplicación de MCho 100 μM durante 60 s produce una disminución en la amplitud del primer pulso del $33,02 \pm 9,67 \%$ en un total de 8 autapsis GABAérgicas estudiadas. Recuperándose la señal a condiciones control tras el lavado del agonista muscarínico. Curiosamente, esta disminución en la amplitud del primer pulso no conlleva una disminución tan dramática en el segundo, lo cual se refleja en la PPR (panel D) que se aproxima a 1 durante la aplicación de MCho ($0,53 \pm 0,07$ y $0,81 \pm 0,07$ en la situación control y MCho respectivamente).

Las conclusiones extraídas tras el estudio en autapsis nos dan otra visión diferente del efecto de la activación de los mAChRs. Claramente descartamos un efecto de MCho sobre las neuronas piramidales glutamatérgicas presentes en el cultivo, pero a nivel de las interneuronas GABAérgicas sí que está modulando la liberación de neurotransmisor.

13. Efecto de la aplicación de MCho sobre las corrientes GABAérgicas generadas por la aplicación de un pulso de corriente en una fibra aislada.

Los datos obtenidos en el estudio de autapsis nos da pie al estudio de los mecanismos de liberación de neurotransmisor y de la velocidad de reciclado vesicular, pero la generación de los protocolos necesarios para este análisis dificulta su evaluación en autapsis, por lo que decidimos que la estimulación de una fibra GABAérgica aislada

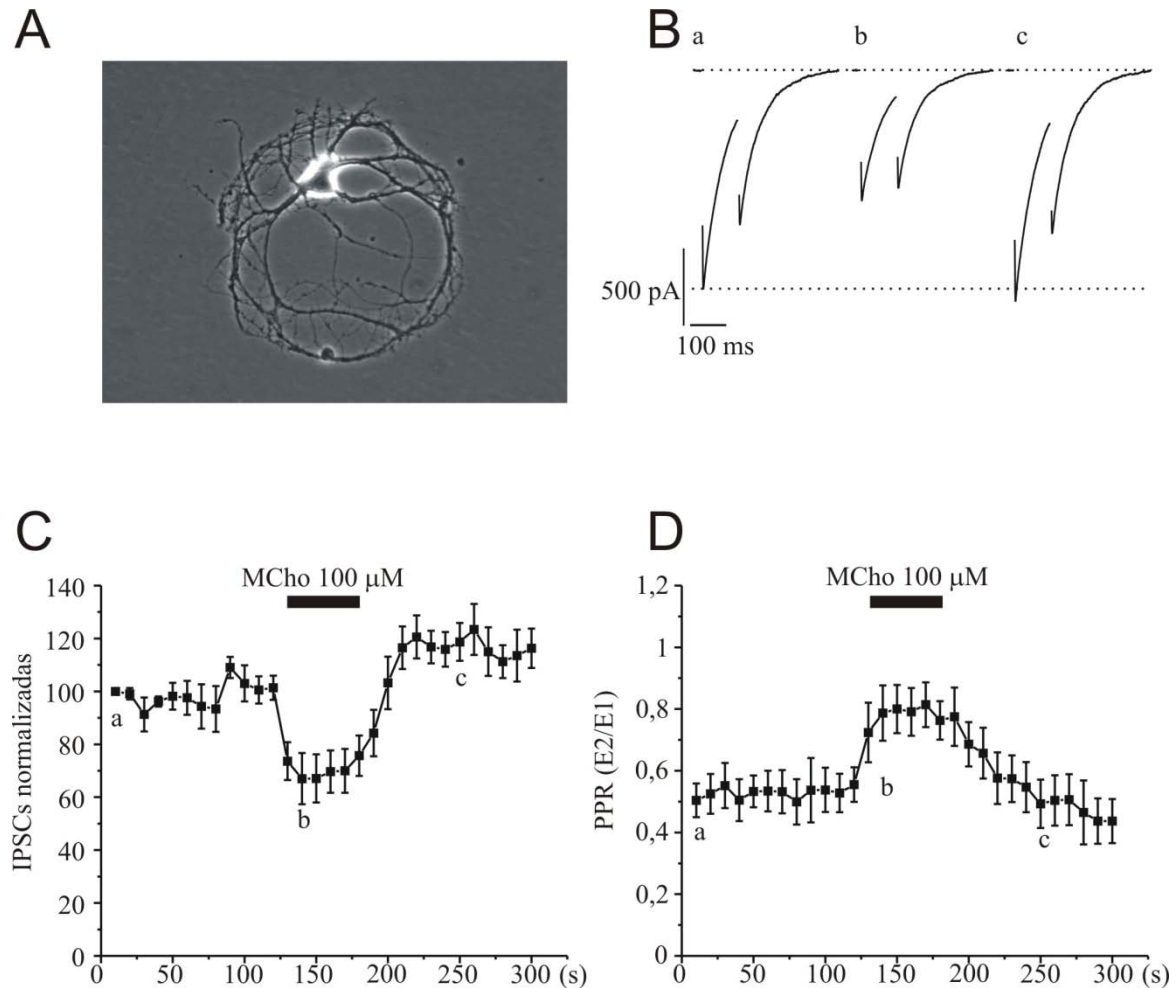


Figura 34. El agonista muscarínico MCho modifica la liberación de neurotransmisor en autapsis GABAérgicas. **A.** Micrografía de una autapsis GABAérgica. **B.** Registros originales en la situación control (a), durante la aplicación del agonista muscarínico (MCho 100 μ M) (b) y tras el lavado del mismo (c). Corriente generada por un par de pulsos de 0.5 ms a +40 mV separados 100 ms entre sí. El protocolo se repite a intervalos de 10 s (0.1 Hz) en células autápticas fijadas a un potencial de membrana de -70 mV. **C.** Curso temporal medio normalizado de la corriente GABAérgica generada por el primer estímulo del par de pulsos. MCho 100 μ M se aplica durante 60 s tal y como indica la barra horizontal. **D.** Diagrama medio de la relación entre pares de pulsos (E2/E1). Datos representados como la media \pm E.S.M. n:8. Se comprueba que la autapsis es GABAérgica por la eliminación de la señal en presencia de bicuculina.

nos permitiría afrontar de un modo más apropiado el estudio.

Pero antes debíamos comprobar si en la metodología de generación de corrientes en fibras aisladas, el efecto de la aplicación de MCho 100 μ M persistía con las mismas características observadas en las autapsis.

La generación de corrientes GABAérgicas en estas condiciones se obtuvo mediante la aplicación de una corriente de entre 5-25 μ A sobre una fibra aferente aislada, que conecta con la célula postsináptica fijada a -70 mV, en un cultivo de baja densidad al que se le superfundió una disolución extracelular Tyrode convencional suplementada con

bloqueantes de los receptores glutamatérgicos (ver sección III). Esta aplicación de corrientes se realiza en pares de pulsos separados por 100 ms a intervalos de 0,1 Hz.

Los datos provenientes de este estudio los presentamos en la figura 35. En el panel A mostramos una micrografía en la que se puede observar la disposición de los electrodos, uno estimulando una fibra presináptica y el otro sobre una célula en la configuración de célula completa de la técnica de *patch clamp* registrando las corrientes postsinápticas y fijando el potencial de membrana de esta célula en -70 mV. Además la inclusión de QX-314 (bloqueante de los canales de Na⁺) en la disolución intracelular, con la que se dializa la célula postsináptica, impide la generación de PAs en la misma (Mulle y col., 1985). En el panel B observamos las corrientes generadas por este protocolo. Efectivamente, la aplicación de MChol 100 μM durante 60 s produce un decremento en la amplitud de la corriente del primer estímulo que va acompañada de una menor disminución del segundo. Como podemos ver en los trazos originales mostrados en el panel B (c), y en el panel C y D, tras lavar el agonista muscarínico del medio, el comportamiento de sinapsis estudiada vuelve a valores basales.

Cuantitativamente, el bloqueo máximo de la aplicación de MChol sobre las corrientes GABAérgicas normalizadas (panel C) fue de $41,61 \pm 4,55$ %, mientras que en la PPR, partiendo de valores iniciales cercanos a 0,65, en la condición MChol alcanza valores muy próximos a 1 ($0,99 \pm 0,7$ máximo) (n:9).

En los paneles E-H mostramos unos diagramas de barras donde analizamos las características cinéticas de la corriente GABAérgica generada por la estimulación de una fibra aislada (tomado como referencia el primer pulso del par). Como se puede observar, la amplitud media disminuye significativamente al aplicar MChol 100 μM ($2,11 \pm 0,13$ y $1,25 \pm 0,17$ nA en la situación control y MChol respectivamente, $p < 0,01$). Sin embargo, ni la velocidad de activación o de deactivación de la corriente se ve alterada por la administración de MChol, aunque sí observamos una demora en la generación de la misma, desde que la estimulación es aplicada en la fibra presináptica (panel F, $p < 0,05$).

En resumen, la aplicación de MChol 100 μM produce una disminución de la liberación de GABA en la fibra estimulada, sin modificar las características cinéticas de la corriente. Sin embargo en el estudio de la relación E2/E1 observamos que el segundo pulso es más eficaz que en la situación control. Es decir, la activación de los receptores muscarínicos disminuye la probabilidad de liberación de neurotransmisor en las células GABAérgicas, pero prepara la sinapsis para la respuesta ante estímulos venideros.

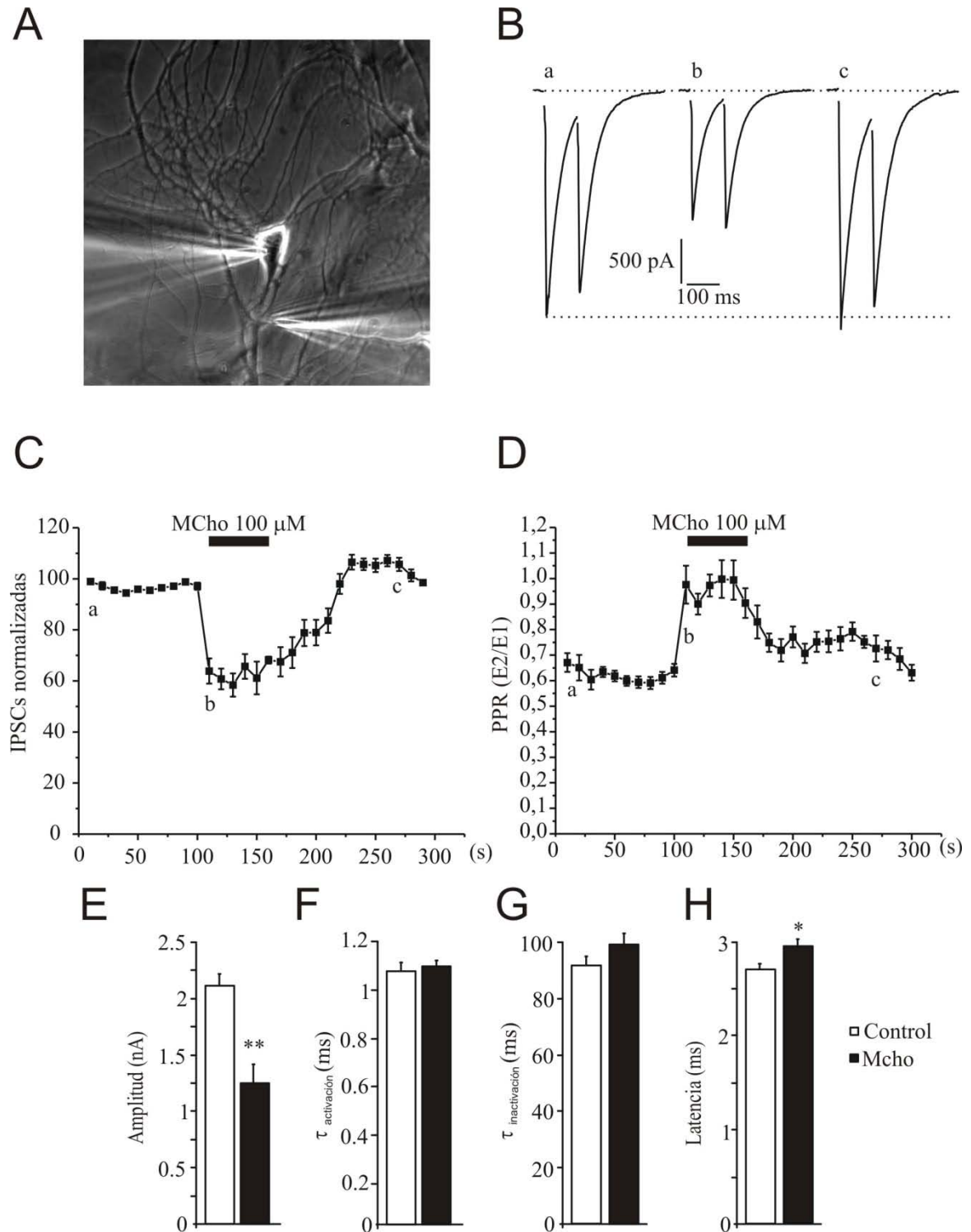


Figura 35. Modulación de la liberación de GABA mediante MCh. **A.** Imagen de la estimulación de fibra aislada en un cultivo de baja densidad. **B.** Trazos originales generados al aplicar una corriente de 0,1 ms de duración a 5-25 μ A, aplicada en pares de pulsos de 100 ms de separación y a un intervalos de 10 s (0,1 Hz). **C.** Corriente normalizada del primer estímulo y **D** relación de pares de pulsos (E2/E1). Se aplica MCh 100 μ M tal y como indican las barras horizontales. **E-H.** Diagramas de barras de la amplitud, velocidad de activación e inactivación y latencia del primer pulso generado en las condiciones reseñadas. Los datos se expresan como la media \pm E.S.M. de un total de 9 células fijadas a -70 mV. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; t de Student.

14. MChO reduce la depresión provocada por la aplicación de pares de pulsos.

El primer protocolo que vimos conveniente aplicar, para el estudio del papel de los receptores muscarínicos sobre la maquinaria exocitótica, fue el denominado depresión por pares de pulsos (PPD). Con anterioridad habíamos aplicado los pares de pulsos sobre la fibra GABAérgica aislada con 100 ms de separación entre ellos. Este protocolo consiste en modificar estos tiempos entre estímulos y así poder analizar la variación de la relación entre pares de pulsos (PPR E2/E1).

La PPR fue analizada en profundidad en las células analizadas en la figura 36. En un total de 15 células fijadas a -70 mV, receptoras de una fibra aferente a la que se le aplicó el protocolo PPD a 20, 30, 40, 50, 80, 200, 400, 800 y 2 000 ms, observamos que la aplicación de MChO 100 μ M aumenta la respuesta del segundo estímulo sobre todo a tiempos cortos.

En el panel A de la figura 36 mostramos trazos originales medios, del intervalo inter-estímulos señalado, de 8 repeticiones consecutivas a intervalos entre pares de 10 s.

Los datos obtenidos en la situación control con este protocolo son en orden ascendente en el intervalo entre estímulos y en % de inhibición del segundo estímulo: $81 \pm 8,7$; $75,1 \pm 6,5$; $68,3 \pm 5,7$; $58,4 \pm 3,4$; $41,4 \pm 2,6$; $17,6 \pm 0,6$; $12,5 \pm 0,3$; $8,1 \pm 0,1$ y $6 \pm 0,1$. La administración de MChO 100 μ M resultó en una disminución significativa en el porcentaje de inhibición del segundo estímulo en todos los puntos estudiados llevándolos a niveles de $62,9 \pm 7$; $57,3 \pm 5,2$; $44,7 \pm 3,7$; $37,9 \pm 3,1$; $20,5 \pm 1,2$; $4,8 \pm 0,3$; $4,3 \pm 0,2$; $2,8 \pm 0,1$ y $3,3 \pm 0,1$ % (ver panel B).

La recuperación de la PPD la ajustamos a una función exponencial de segundo orden que generó dos cinéticas. En la situación control obtuvimos una cinética rápida y una lenta con valores de $\tau_{\text{rápida}} = 46 \pm 7$ ms y $\tau_{\text{lenta}} = 158 \pm 95$ ms. Durante la aplicación de MChO el ajuste de los datos nos brindó unas cinéticas $\tau_{\text{rápida}} = 39 \pm 5$ y $\tau_{\text{lenta}} = 382 \pm 30$ ms.

La interpretación que realizamos de estos datos es que la aplicación de MChO está afectando a nivel presináptico, disminuyendo la amplitud del primer estímulo por un posible decremento en la probabilidad de liberación de neurotransmisor y que la disminución de la PPD posiblemente sea por una acción sobre los contingentes vesiculares o sobre los CCDV.

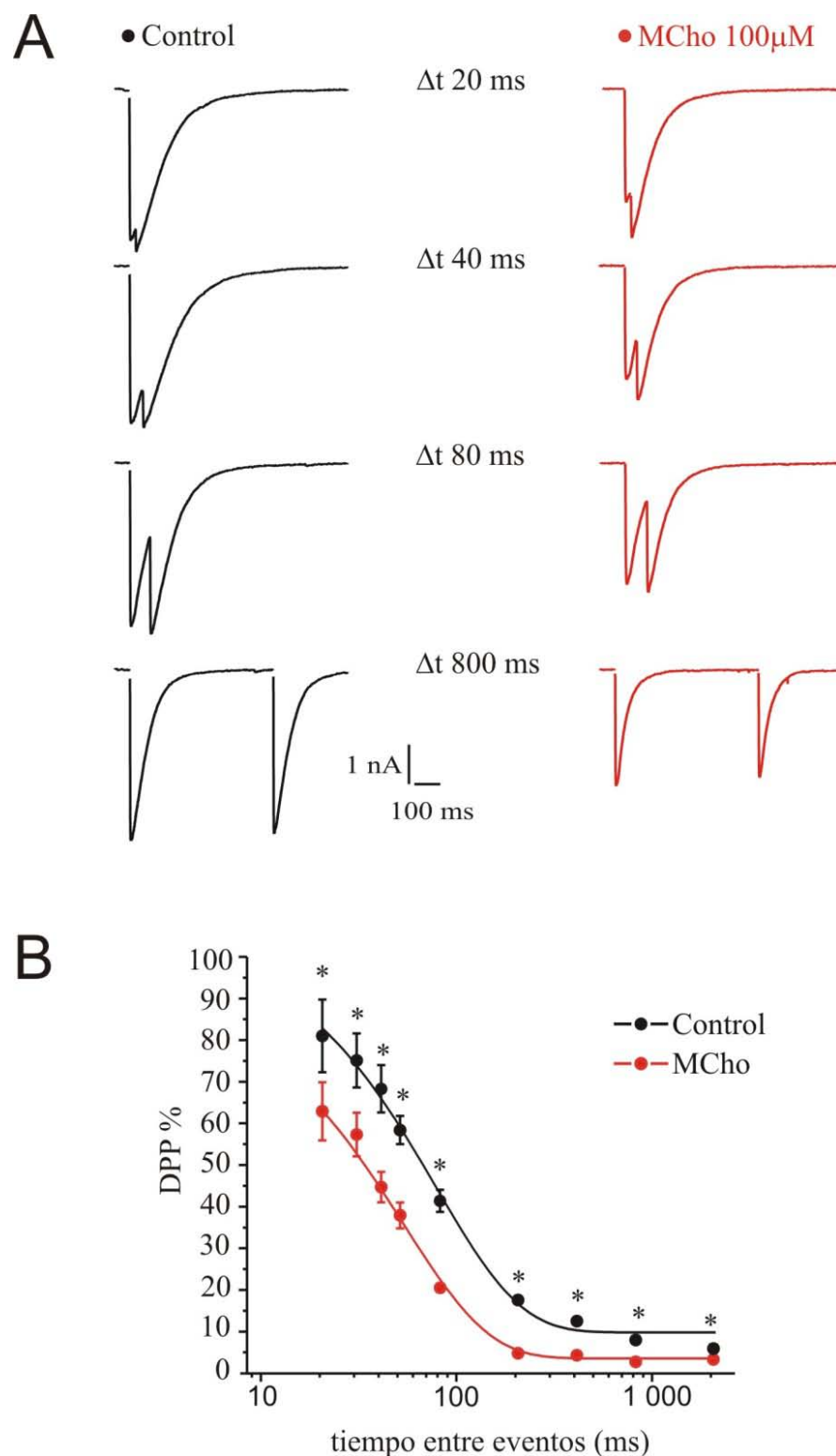


Figura 36. Efecto de la activación de los mAChRs en la depresión por pares de pulsos. **A.** Trazos originales de pares de pulsos a diferentes intervalos en la situación control (negro) y MChol (rojo). **B.** Datos medios de la PPR a tiempos de 20, 30, 40, 50, 80, 200, 400, 800 y 2 000 ms ajustados a una función exponencial. Datos representados como la media \pm E.S.M. n: 15. * $p < 0,05$; t de Student.

15. MChO reduce la probabilidad de liberación de neurotransmisor sin modificar el tamaño del contingente vesicular listo para liberación.

Para investigar en detalle los mecanismos presinápticos alterados por la activación de los mAChRs, quisimos evaluar la probabilidad de liberación de las fibras aferentes GABAérgicas a estudio y analizar si la aplicación de MChO modificaba de alguna forma el contingente vesicular listo para liberación (RRP) a la llegada de un PA.

Para ello utilizamos un protocolo de estimulación consistente en la aplicación de un tren de estímulos (40 estímulos en 1 s; 40 Hz) que nos permitió encontrar un equilibrio entre el número de vesículas liberadas y el número de vesículas recicladas (Schneggenburger y col., 1999).

Como se puede observar en el panel A de la figura 37 la aplicación de pulsos a alta frecuencia produce una inmediata depresión de la corriente generada, tanto en condiciones control como durante la aplicación de MChO 100 μ M. Las corrientes GABAérgicas generadas por el tren de estímulos se representaron de forma acumulativa en el panel B. En ambos grupos experimentales, observamos una primera fase de acumulación rápida de corriente para estabilizarse posteriormente en los últimos pulsos.

Si utilizamos los 25 últimos pulsos de cada situación experimental para ajustarlos a una regresión lineal, puesto que es el número máximo de puntos que mejor se ajustan a una regresión lineal, la extrapolación de esta función a 0, nos facilita un dato muy representativo de la situación experimental, el tamaño del contingente listo para liberación (RRP). La amplitud en este punto representaría la generación de una corriente si se liberasen el 100% de las vesículas disponibles. Como se ve en el diagrama de barras del panel B la activación de los receptores muscarínicos no modifica el tamaño de este contingente $3,63 \pm 0,4$ y $3,57 \pm 0,8$ nA en la situación control y tras la aplicación de MChO 100 μ M respectivamente, en un total de 11 células sometidas a este protocolo en cada grupo experimental.

A partir del dato del tamaño del RRP se pueden realizar diferentes cálculos que aportan datos interesantes. Si lo enfrentamos al tamaño de la primera corriente generada, obtenemos la probabilidad de liberación de neurotransmisor en la fibra aferente estimulada, siendo en el caso de la situación control $0,53 \pm 0,04$ y disminuyendo ésta significativamente en la situación MChO $0,35 \pm 0,05$ ($p < 0,01$). Además, teniendo en cuenta el tamaño cuantal (c) de la liberación de una sola vesícula (amplitud media de una

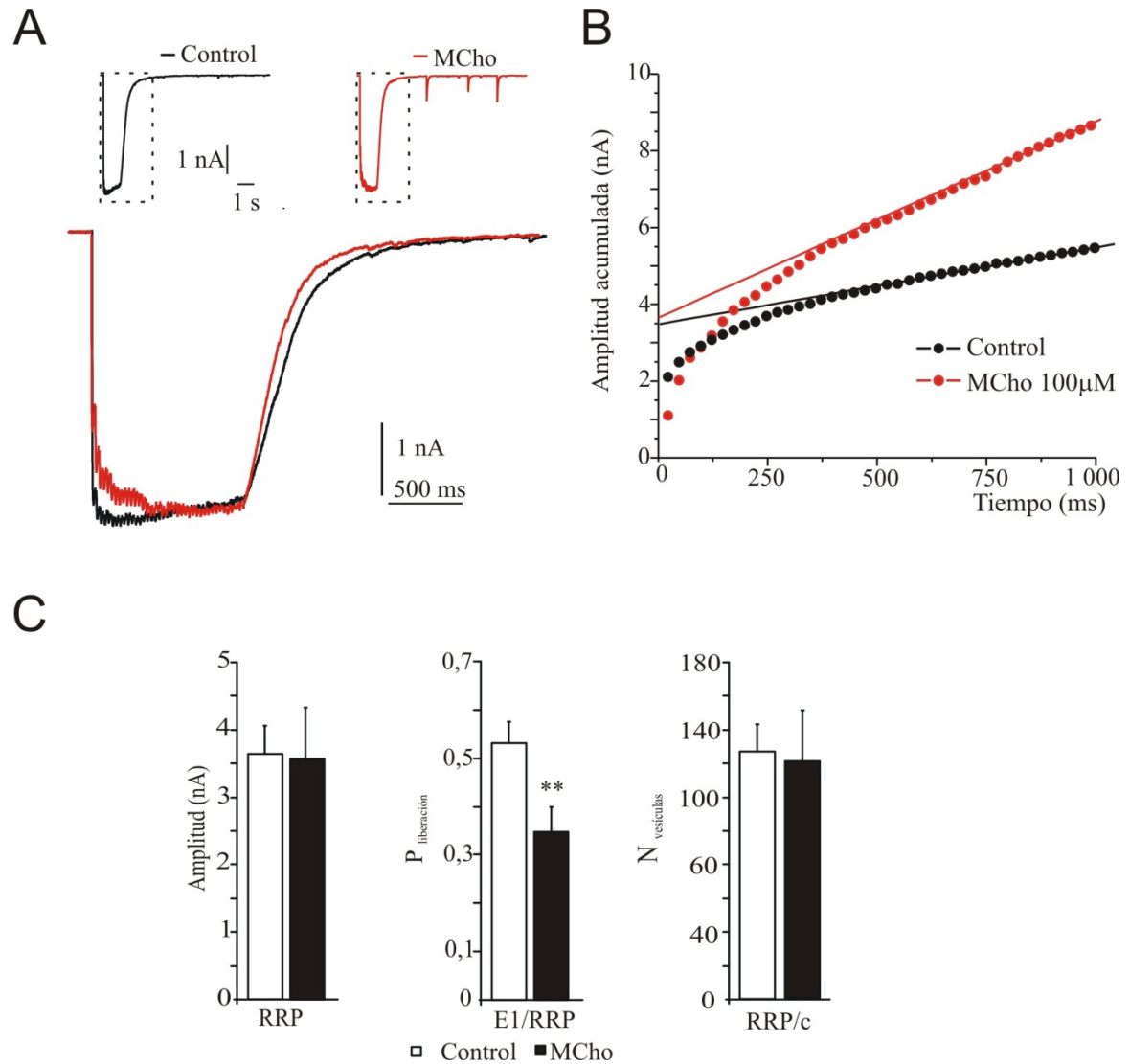


Figura 37. La activación de los mAChRs disminuye la probabilidad de liberación sin afectar al tamaño del RRP. **A.** Registros representativos de un tren de 40 estímulos a una frecuencia de 40 Hz en situación control (negro) y durante la aplicación de MCh 100 μ M (rojo). **B.** Representación de la amplitud acumulada de las corrientes generadas por el tren de estimulación. Representamos el ajuste a una regresión lineal de los últimos 600 ms de acumulación y lo extrapolamos al eje Y. Este dato representa la amplitud total de corrientes que se generaría por la liberación de todo el RRP. **C.** Diagramas de barras que representan el tamaño medio de los RRP, la probabilidad de liberación y el número de vesículas medio presentes en las fibras aferentes a estudio. E₁: estímulo 1; c: tamaño cuantal. La representación de los datos es mediante la media \pm E.S.M. n:11. **p < 0,01 tras test t de Student.

mPSC) podemos calcular el número total de vesículas que conformaría el RRP siendo 131 ± 14 y 126 ± 27 en la situación control y MCh respectivamente.

En el panel A de la figura 38 mostramos una función de los datos normalizados, de cómo va disminuyendo la amplitud en cada una de las 40 corrientes generadas durante el estímulo de 40 Hz (1 s). Esta función la podemos ajustar a una doble exponencial que nos aporta los datos consecuentes de la velocidad de caída de las corrientes. Vemos que

en condiciones control, existen dos velocidades de pérdida de corriente. Una primera mucho más rápida nos refleja un dato de $\tau_{\text{rápida}} = 10,7 \pm 2$ ms y una más lenta de $\tau_{\text{lenta}} = 182 \pm 34$ ms. Estas velocidades de pérdida de corriente se quedan en una situación de estacionamiento o corriente estacionaria (I_{ss}) del $2,4 \pm 0,8\%$ de la corriente basal. En la situación MCho los datos obtenidos fueron $\tau_{\text{rápida}} = 26,5 \pm 8$ ms, $\tau_{\text{lenta}} = 451 \pm 134$ ms y una $I_{ss} = 9,5 \pm 3\%$ de la corriente basal en esta condición.

Previamente a la aplicación del tren y tras éste, registramos la condición basal de liberación de neurotransmisor mediante pares de pulsos aplicados a intervalos de 10 s. En la situación control, tras la aplicación del tren de 40 Hz, observamos una caída de la corriente (depresión post-tetánica, PTD) que representamos en el panel D de la figura 38, con una duración aproximada de 30-50 s. La administración de MCho 100 μ M impide la PTD, manifestándose de forma significativa durante los primeros 30 s ($p < 0,05$ con respecto a la situación control). Cuantitativamente, tras 10 s post-tetización en la situación control, la IPSC se reduce a un $78,5 \pm 10 \%$ de la corriente control mientras que en la condición MCho se mantiene en los valores control ($107,4 \pm 4 \%$).

Por otro lado también analizamos la PPR antes (b) y después (a) de la aplicación del tren de estimulación de 40 Hz, observando que no varía tanto en la condición control como en la situación MCho (ver panel E de la figura 38).

En la situación control la PPR de la situación control fue de $0,62 \pm 0,04$ antes y $0,63 \pm 0,05$ después del tren, mientras que durante la aplicación de MCho la PPR fue de $0,90 \pm 0,01$ y $0,92 \pm 0,1$ antes y después de la aplicación del tren de 40 Hz.

Estos datos sugieren que esta plasticidad a corto tiempo no se debe a los cambios observados en la probabilidad de liberación quedando la duda de que se deba a un aumento en la velocidad de reciclado vesicular o a un bloqueo de los CCDV.

16. Colaboración específica de los subtipos de CCDV de alto umbral en la liberación de GABA al estimular una fibra aislada.

En experimentos previos habíamos demostrado que la activación de los mAChRs bloqueaba parcialmente las señales de Ca^{2+} somáticas, con un bloqueo sensiblemente superior de los canales de alto umbral de tipo-N y tipo-P/Q. Quisimos corroborar esta hipótesis, y comprobar la implicación de cada uno de los subtipos de canales de Ca^{2+} en la liberación de neurotransmisor en el terminal sináptico de la fibra estimulada.

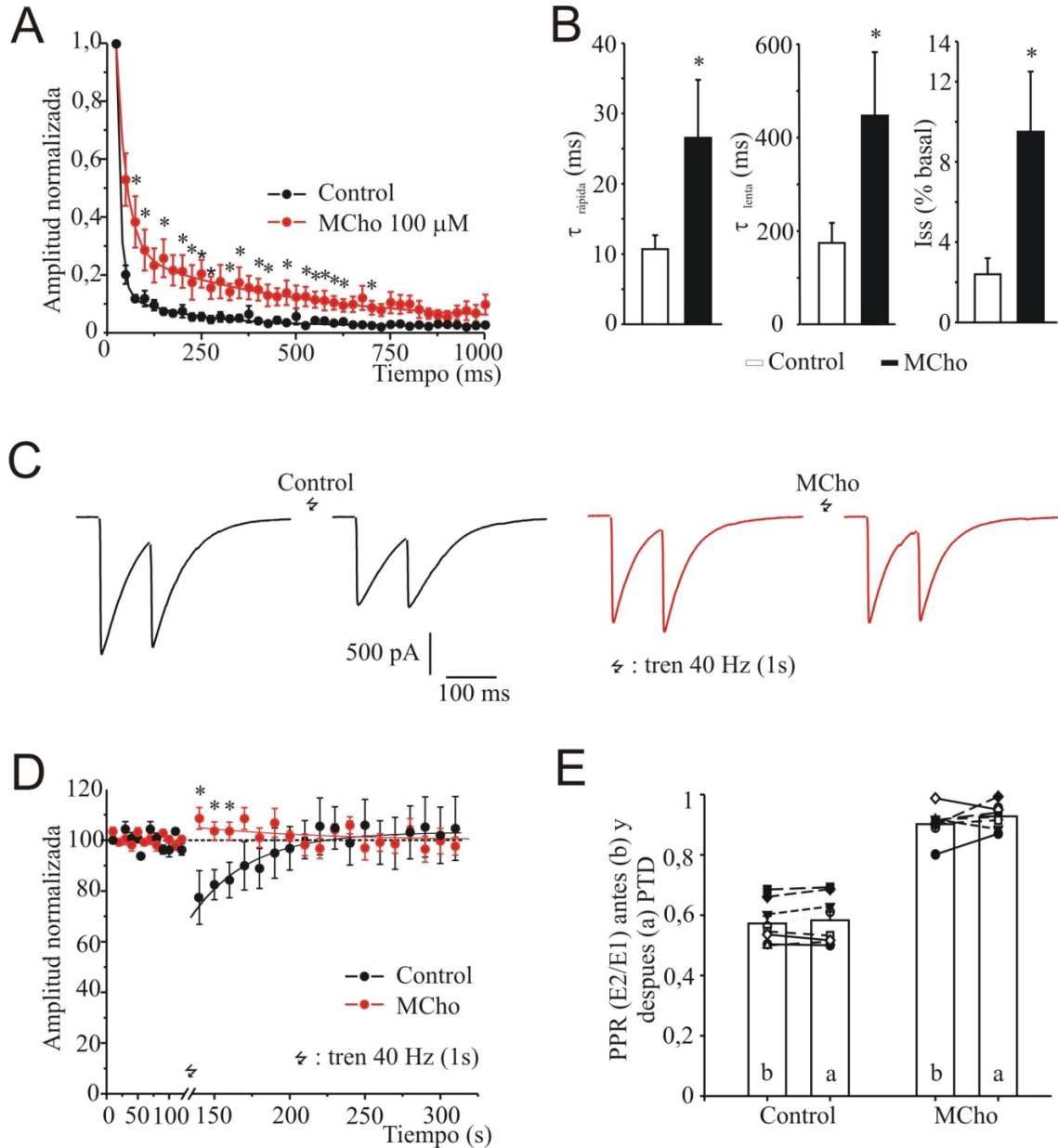


Figura 38. Efecto de MChol en la depresión sináptica inducida por un tren de estimulación de 40 Hz. **A.** Curso temporal de la media de corrientes normalizadas durante el tren de estímulos en la condición control (negro) y MChol 100 μ M (rojo), ajustado a una función doble exponencial. **B.** Diagramas de barras que representan los datos de la función doble exponencial en forma de velocidad rápida y lenta, así como el porcentaje de corriente estacionaria al final del tren (* $p < 0,05$ con respecto a la situación control). **C.** Trazos originales de los pares de pulsos aplicados antes e inmediatamente después de la aplicación del tren en la condición control y MChol. **D.** Representación del curso temporal de 11 células de la evolución de la depresión post-tetánica (PTD). Pares de pulsos aplicados a una frecuencia de 0,1 Hz. **E.** PPR (E2/E1) antes (b) y después (a) de la aplicación del tren, en cada condición. Media \pm E.S.M. $n:11$.

Para ello nos valimos de las mismas herramientas farmacológicas anteriormente utilizadas para el bloqueo selectivo de las corrientes de tipo-L (nifedipino 3 μ M), de tipo-N (ω -conotoxina GVIA 1 μ M) y de tipo-P/Q (ω -agatoxina IVA 2 μ M), quedando las corrientes de tipo-R sin bloquear.

En la figura 39 mostramos el resultado final de la aplicación del siguiente protocolo en 12 células (6 por situación experimental). Aplicando un primer estímulo generamos una corriente postsináptica en la que todos los subtipos de canales participaban. A partir de esta situación control se fue administrando acumulativamente las toxinas específicas de cada uno de los canales de Ca^{2+} , hasta quedar una corriente residual atribuida al canal de tipo-R (ver panel A).

La cuantificación media de cada una de las condiciones experimentales arroja una participación en la liberación de GABA en el terminal a estudio del $11,8 \pm 3$ % del canal de tipo-L; $27,7 \pm 2$ % del tipo-N; $31,5 \pm 3$ % del tipo-P/Q y $28,8 \pm 3$ % del tipo-R en la situación control. Es decir, excepto el canal de tipo-L, poco implicado en la liberación de neurotransmisor, el resto de canales participa de forma equitativa en el proceso secretor. Cuando se añadió MChol 100 μM a este protocolo los resultados obtenidos fueron que la mayor participación de un canal en la liberación de neurotransmisor es la del tipo-R con un $59,3 \pm 5$ %, posiblemente debido a que tome el papel de los canales bloqueados por MChol, los canales de tipo-N y -P/Q con una participación en estas condiciones del $13,8 \pm 5$ % y del $9,1 \pm 2$ % respectivamente. La participación del canal de tipo-L no se ve comprometida en presencia de MChol, manteniendo una participación del $17,7 \pm 3$ %.

A la vista de estos datos queda claro que el agonista muscarínico está afectando a la liberación de neurotransmisor disminuyendo la probabilidad de liberación de neurotransmisor al bloquear específicamente los CCDV implicados en los procesos secretores. Sin embargo estos datos no explicarían por completo el efecto de MChol. Debemos explorar la posibilidad que MChol esté afectando al proceso exocitótico.

17. La aplicación de MChol aumenta la velocidad de reciclado vesicular tras la aplicación de un tren largo a 8 Hz.

Para evaluar la velocidad de reciclado vesicular, precisamos de un protocolo que permite agotar el contingente listo para liberarse. Así aplicamos un tren de 600 pulsos durante 75 s (8 Hz) (Zucker y Regehr, 2002).

En la figura 40 mostramos los datos obtenidos con este protocolo. En el panel A mostramos el inicio y el final de las corrientes obtenidas durante el tren de estímulos, mostrando en negro los trazos control y en rojo los de la situación MChol 100 μM . El estudio de las corrientes generadas por la aplicación de este tren provoca una pérdida de

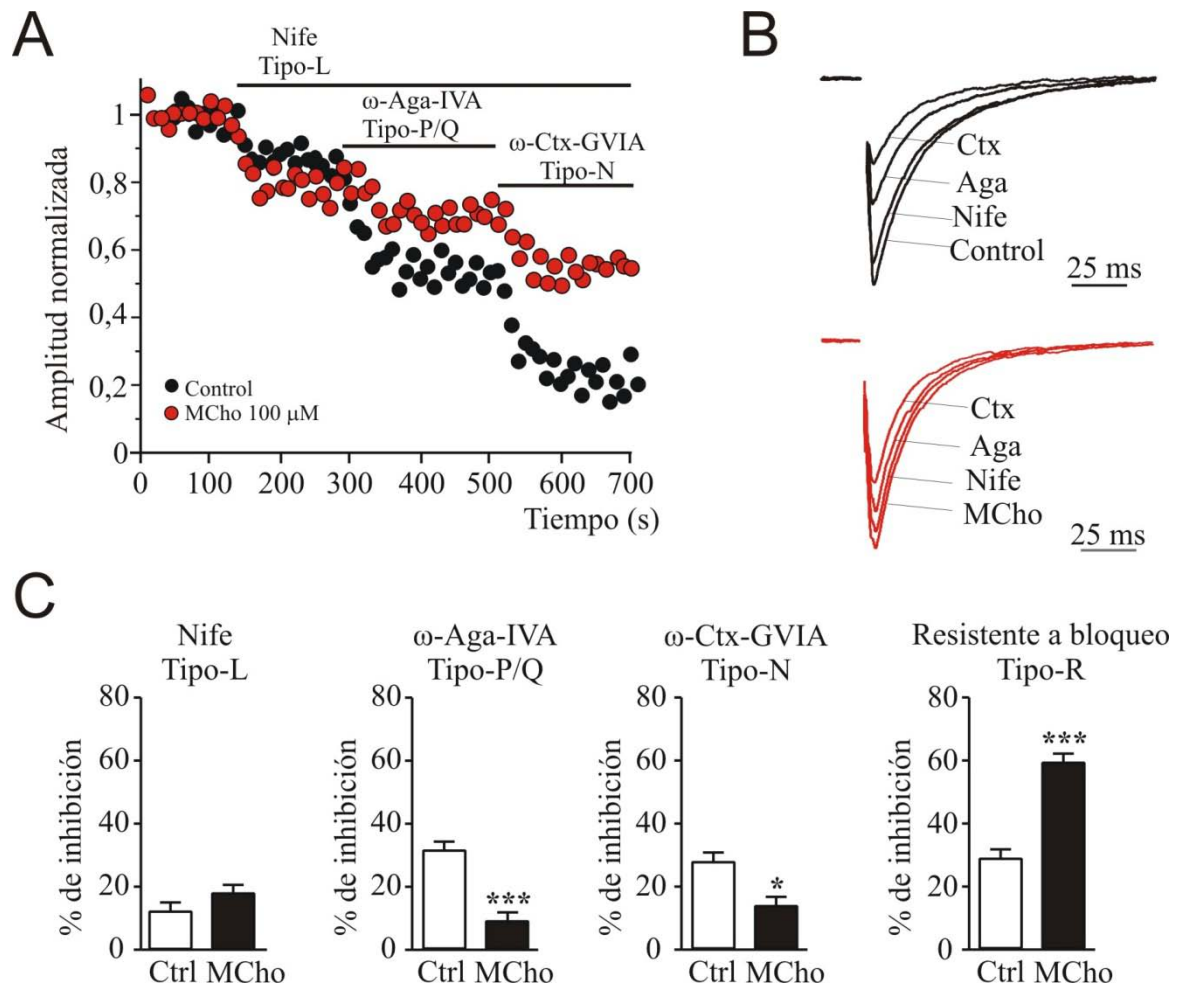


Figura 39. Disecación farmacológica de la participación de los subtipos de canales de Ca^{2+} en la generación de IPSCs. **A.** Curso temporal de la amplitud normalizada de dos células representativas de la media en situación control (círculos negros) y MChol 100 μM (círculos rojos). Las toxinas nifedipino 3 μM, ω-conotoxina GVIA 1 μM y ω-agatoxina IVA 2 μM se aplicaron tal y como indican las barras horizontales. **B.** Trazos representativos de la aplicación acumulativa de las toxinas en situación control (trazos negros) y MChol (trazos rojos). **C.** Diagramas de barras representando la contribución media de cada uno de los subtipos de CCDV. Los datos representan la media ± E.S.M. de 6 células control y 6 células MChol. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (t de Student).

amplitud de las corrientes GABAérgicas que se ajusta a una función doble exponencial. El componente rápido de la función arroja datos de $0,65 \pm 0,2$ y $0,71 \pm 0,3$ s en la situación control y MChol respectivamente. Por otro lado durante la aplicación de MChol 100 μM la velocidad de caída lenta de la función es de $25,1 \pm 3,5$ s con respecto a los $21,55 \pm 2,4$ s del tren aplicado en situación control. Sin embargo en la situación control la I_{ss} al final del tren es del 13% de la corriente basal, mientras que MChol sólo disminuye al 33,5 % al final de la aplicación del tren de 600 pulsos ($p < 0,01$).

Al igual que en el protocolo de estimulación de un tren a 40Hz mostrado en el grupo experimental anterior, aplicamos pares de pulsos a una frecuencia de 0,1 Hz antes y

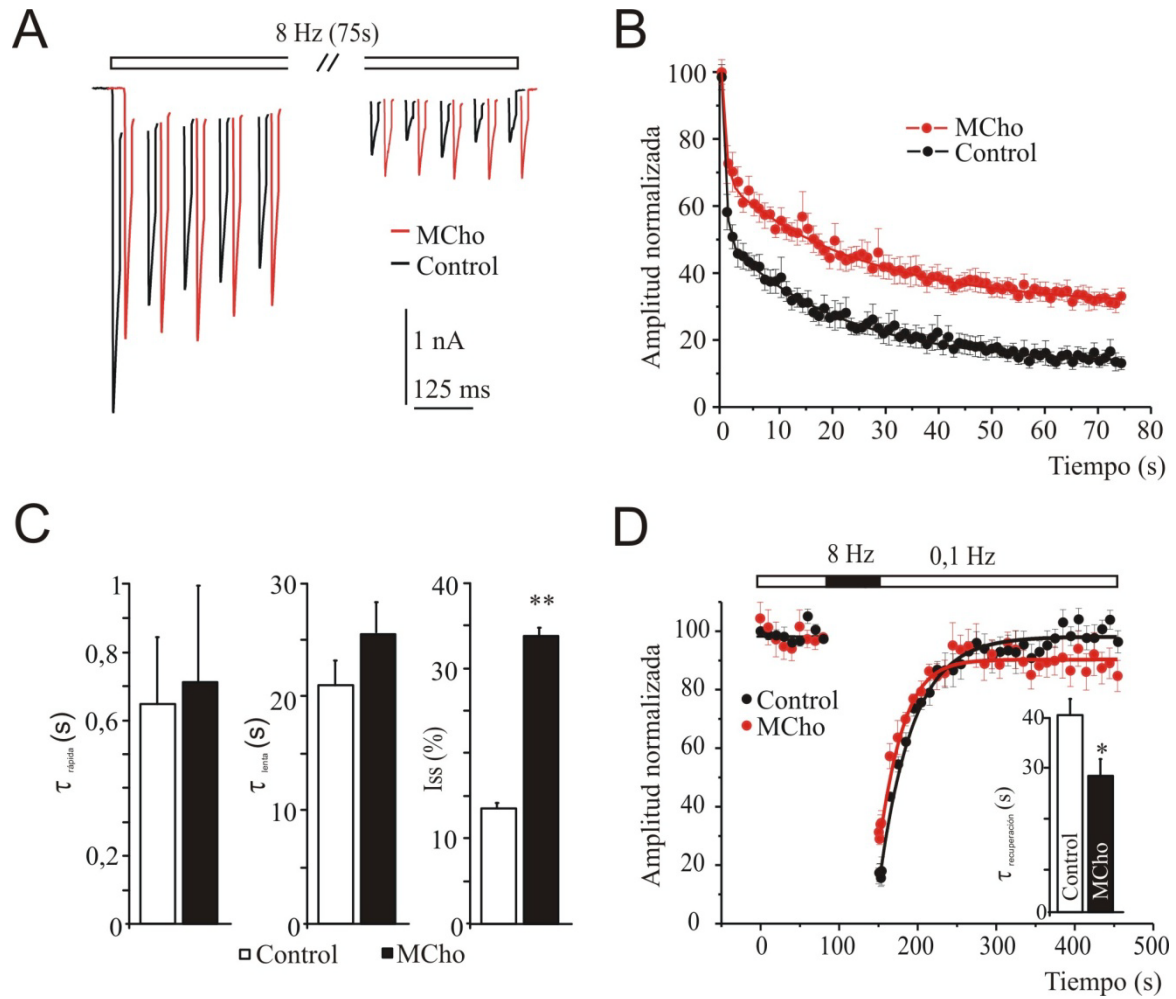


Figura 40. *MChol reduce la depresión sináptica producida por un tren de 600 pulsos a 8 Hz y aumenta la velocidad de recuperación de la corriente.* **A.** Trazos resumen representativos de las corrientes provocadas por un tren de 75 s de duración a 8 Hz. En negro se observa la situación control y en rojo la situación de MChol 100 μ M. **B.** Curso temporal de la depresión media de las corrientes del tren. **C.** Diagrama de barras representando los parámetros cinéticos del ajuste a una función doble exponencial y de la corriente estacionaria registrada. **D.** Curso temporal de la recuperación post-tétano de los pares de pulsos aplicados a 0,1 Hz antes y después del tren. El diagrama muestra la velocidad de recuperación en cada una de las condiciones experimentales. Los datos se muestran como la media \pm E.S.M. n:7. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ frente a la situación control (t de Student).

después de la aplicación del tren largo a 8 Hz. El tren provoca una profunda depresión de las corrientes GABAérgicas que se recupera a los 120 s. Ambas evoluciones en la recuperación de las corrientes, tanto en la condición control como en la condición MChol, se ajustan a una función exponencial de primer orden. Los datos obtenidos demuestran que con la activación de los mAChRs la recuperación de la corriente basal es mucho más rápida ($\tau = 28,7 \pm 3$ s) que en la condición control ($\tau = 4,9 \pm 3$ s) en un total de 7 células para cada condición. Estos datos reflejan que el uso de agonistas muscarínicos capacita a la fibra aferente GABAérgica para aguantar periodos intensos de actividad sináptica, probablemente debido a un aumento de la velocidad de reciclado vesicular.

DISCUSIÓN

Las proyecciones colinérgicas desde el núcleo del septum medial del prosencéfalo basal al hipocampo, así como las interneuronas colinérgicas intrínsecas juegan un papel crítico en la funciones cognitivas (Drachman y Leavitt, 1974; Cole y Nicoll, 1983; Decker y McGaugh, 1991; Fibiger, 1991; Dutar y col., 1995; Markowska y col., 1995).

Los procesos de aprendizaje y memoria ocurren como resultado de la liberación de ACh en el hipocampo (Givens y Olton, 1994; Apartis y col., 1998). Al igual que las neuronas colinérgicas septo-hipocampales, que inervan casi todos los tipos neuronales a nivel hipocampal (Frotscher y Leranth, 1985), las neuronas GABAérgicas de esta vía inervan selectivamente ciertas interneuronas GABAérgicas en esta estructura cerebral (Liu y col., 1998), produciendo un efecto desinhibidor poderoso sobre las neuronas piramidales hipocampales (Toth y col., 1997). Esta característica anatómica es fundamental en la generación de LTP ya que estas neuronas GABAérgicas están profundamente reguladas por mAChRs (Liu y col., 1998). Este mecanismo desinhibidor podría explicar la potenciación cognitiva efectuada por los agonistas muscarínicos (Wu y col., 2003). En adición a la acción moduladora sobre la excitabilidad y plasticidad celular (Marino y col., 1998), debemos considerar que la localización de los mAChRs en los terminales colinérgicos presinápticos induce una inhibición retroalimentada de la liberación de ACh (Zhang y col., 2002). Esto es significativo porque dentro del hipocampo, existe una fuerte interacción inhibitoria recíproca entre los sistemas colinérgico y GABAérgico (Manuel y Davies, 1998; Morton y col., 2001). Aunque tenga efectos sintomáticos leves, el aumento de la transmisión colinérgica en el hipocampo es la base del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Rogers y col., 1998; Wilkinson y Murray, 2001).

Los mAChRs están considerados como los principales receptores colinérgicos implicados en las funciones cognitivas (Beatty y col., 1986; Nathanson, 1987; Pavia y col., 1998). El bloqueo de éstos o la lesión de las proyecciones septo-hipocampales provoca déficits de atención y generación de memoria (Drachman y Leavitt, 1974; Sutherland y col., 1982; Fibiger, 1991; Callahan y col., 1993; Roldan y col., 1997), mientras que la activación de los mismos es capaz de mejorar la pérdida de funciones mnemónicas ocasionadas por la enfermedad de Alzheimer (Davies y Maloney, 1976; Whitehouse, 1993). Además se han observado alteraciones en el funcionamiento de los mAChRs en desordenes cerebrales como la esquizofrenia y la epilepsia (Olton y col., 1991a; Olton y col., 1991b; Olton y col., 1991c).

Es conocido que la neurotransmisión colinérgica permite alcanzar concentraciones en el rango de mM de neurotransmisor en la hendidura sináptica (Sarter y Parikh, 2005) por lo que es imprescindible una fuerte regulación en la eliminación de la ACh. La finalización de la actividad del neurotransmisor depende de la velocidad de disociación de ésta con el receptor y la subsecuente hidrólisis por las colinesterasas encargadas de la degradación de este neurotransmisor, proceso que ocurre en pocos ms (Anglister y col., 1994; Nair y col., 1994; Tai y col., 2003). La distribución cerebral de las colinesterasas incluye tanto a las neuronas ChAT positivas como a las neuronas colinoceptivas y su actividad se ha registrado en estriado, corteza e hipocampo (Anwar y col., 2012).

Un problema de particular interés relaciona al sistema colinérgico con el sistema GABAérgico (Arnaiz-Cot y col., 2008). En el hipocampo, las interneuronas representan una población heterogénea (Freund y Buzsaki, 1996; Maccaferri y Lacaille, 2003) pero todas ellas expresan mAChRs (Van der Zee y Luiten, 1993). Por tanto un incremento en el conocimiento de la liberación de GABA modulado por mAChRs y de la conectividad neuronal entre el sistema colinérgico y GABAérgico contribuirá a un mejor entendimiento de la fisiología y fisiopatología hipocampal y podría trasladarse a una potencial modulación terapéutica de la neurotransmisión GABAérgica.

El objetivo principal de este trabajo de investigación es aclarar la implicación de los mAChRs en la modulación del sistema GABAérgico. La inhibición ejercida por las neuronas GABAérgicas puede tener un papel opuesto en la red neuronal. Cuando estas sinapsis conectan sobre células piramidales reducen la excitabilidad de la red; sin embargo, cuando contactan con otras interneuronas se produce un incremento en la excitabilidad del sistema neuronal (Gulyas y col., 1996).

Para estudiar este problema realizamos un profundo estudio electrofisiológico usando como material biológico neuronas embrionarias de hipocampo de rata en la segunda o tercera semana en cultivo (Swanwick y col., 2006). En estos cultivos tenemos presencia mayoritaria de neuronas piramidales o excitadoras que utilizan el glutamato como principal neurotransmisor, mientras que la población de interneuronas o células inhibitoras que usan el GABA como herramienta de comunicación representa el 10-15 % del total de las células (Benson y col., 1994). Usando la técnica de *patch clamp* registramos tanto modificaciones del potencial de membrana como trasiegos de corrientes, dependiendo de si estamos registrando en modo fijación de corriente o en modo fijación de voltaje (ver sección III para más detalles).

En estos primeros experimentos del estudio utilizamos una disolución interna basada en el metanosulfonato con ausencia de aniones Cl^- (ver sección III para más detalles) que nos permite prescindir de bloqueadores de la transmisión glutamatérgica, evitando así una posible interferencia farmacológica (Arnaiz-Cot y col., 2008) o una disminución de la excitabilidad de la red neuronal. Esta aproximación experimental permite el registro de amplias corrientes de salida a potenciales de fijación de 0 mV que son sensibles al bloqueador de receptores GABA_A bicuculina. Un enfoque similar lo usaron Barker y Harrison en (1988) en células embrionarias hipocampales en cultivo; usando una disolución intracelular con una concentración de 4,2 mM de Cl^- encontraron un potencial de reversión para este anión alrededor de -64 mV. Este protocolo experimental está basado en la conversión de la transmisión GABAérgica de excitadora a inhibidora que ocurre a estadios tempranos en el desarrollo cerebral (Owens y col., 1996; Ehrlich y col., 1999; Rivera y col., 1999). El principal neurotransmisor inhibidor en el SNC adulto es el GABA, pero este neurotransmisor es el encargado de producir la mayoría de los procesos excitadores durante las primeras semanas postnatales, cuando las entradas excitadoras del cerebro maduro están pobremente desarrolladas (Cherubini y col., 1991; Ben-Ari y col., 1994). Durante el desarrollo postnatal, la transmisión GABAérgica experimenta un cambio radical de excitadora a inhibidora. La concentración de Cl^- intracelular es mayor en neuronas inmaduras que en células adultas debido a un retraso en la maduración de los mecanismos de cotransporte K^+/Cl^- que permite la salida de Cl^- del interior celular (Álvarez-Leefmans, 1990; Zhang y col., 1991; Ganguly y col., 2001). Además, hay trabajos que describen que la aplicación de GABA en el soma provoca una hiperpolarización dependiente de Cl^- , mientras que la aplicación a nivel dendrítico produciría una despolarización o una respuesta mixta (Collingridge y col., 1984; Segal y Barker, 1984). En nuestro estudio aceptamos que las acciones de GABA se localizan en el soma o al menos muy cerca del mismo, puesto que únicamente podemos asumir que la fijación de voltaje se realiza adecuadamente en esta región (Johnston y Brown, 1983).

Nosotros comparamos la relación entre la intensidad de la I_{GABA} registrada y el potencial de fijación obtenida con diferentes soluciones intracelulares. Bajo condiciones simétricas de Cl^- en el interior y el exterior registramos una relación lineal entre corriente y voltaje, de igual modo que varía la corriente registrada en canal único con el potencial de membrana (Zhang y Jackson, 1993). Sin embargo, registramos una modesta

rectificación en las corrientes de salida cuando las concentraciones de Cl^- dentro y fuera eran asimétricas, lo que concuerda con registros de canal único registrados en neuronas espinales en cultivo (Hamill y col., 1983) y en neuronas de hipocampo (Collingridge y col., 1984; Barker y Harrison, 1988), que puede ser atribuida a alteraciones en las cinéticas de los canales o a cambios de conductancia en los mismos.

Por tanto, para evitar el uso de antagonistas glutamatérgicos y para aislar metodológicamente las corrientes postsinápticas inhibitoras, fijamos el potencial de membrana de la célula postsináptica a 0 mV y usamos una disolución intracelular basada en el metanosulfonato con una ausencia total de aniones Cl^- .

1. Los agonistas colinérgicos aumentan la excitabilidad de las neuronas de hipocampo.

Está bien establecido que los nAChRs juegan un papel crítico en la plasticidad sináptica y en las funciones cognitivas (Dani y Bertrand, 2007); aún así, el papel modulador de la transmisión colinérgica en los circuitos más importantes del SNC es mediada por los mAChRs (Brown y Zador, 1990; Rouse y col., 1999).

Para estudiar el efecto de la activación de los AChRs sobre el potencial de membrana en neuronas en cultivo con la corriente fijada, elegimos el agonista endógeno ACh, la nicotina como agonista nAChRs y la MChol como agonista mAChRs a una concentración saturante de 100 μM (Waugh y col., 1999). Tal y como ocurre con la activación de nAChRs (Cole y Nicoll, 1984; Alkonon y col., 1999; Arnaiz-Cot y col., 2008) donde los agonistas selectivos de éstos inducen una breve despolarización acompañada por una pequeña salva de PAs, MChol fue capaz de potenciar el disparo de ráfagas de PAs. Estos datos son consistentes con observaciones previas en las que ACh ejercía una excitación sensible a atropina sobre neuronas piramidales (Cole y Nicoll, 1984; Halliwell, 1990). Se conoce que en respuesta a activación colinérgica, las neuronas responden mediante despolarizaciones de membrana y disparo de PAs. Estos mecanismos ocurren a través de la inhibición de algunas conductancias de K^+ (Dutar y col., 1995) o por la activación de conductancias catiónicas (Colino y Halliwell, 1993; Fisahn y col., 2002; Young y col., 2005) o bien por la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisor (Raiteri y col., 1984; Pohorecki y col., 1988). También puede ejercer esta modulación por medio de diferentes mecanismos de traducción de señalización

bioquímica (Power y Sah, 2002) llegando incluso a modular procesos más complejos como la LTP o la LTD (Markram y Segal, 1990; Williams y Johnston, 1990).

Nosotros obtuvimos una potenciación de los disparos de PAs provocada por MCho en neuronas con pocas conexiones, con el propósito de prevenir las interferencias con células vecinas. Esta potenciación de la excitabilidad celular se traslada a una potenciación de la liberación de neurotransmisor. Por tanto, en neuronas interconectadas, la potenciación en la liberación de GABA por MCho en las neuronas presinápticas se observa como un incremento en el registro de IPSCs en la célula fijada y registrada.

En trabajos realizados con células de la corteza prefrontal se demostró que MCho también incrementa las corrientes postsinápticas (Ma y col., 2003). Por otro lado, se conoce que el incremento de los potenciales postsinápticos inhibidores en células piramidales está mediado por un aumento en la excitabilidad de las neuronas inhibitoras, que son activadas a su vez por actividad colinérgica a nivel de mAChRs (Pitler y Alger, 1992; Behrends y ten Bruggencate, 1993). En realidad, la mayoría de los estudios se han centrado en las aferencias colinérgicas sobre las células piramidales, donde la activación de los mAChRs regula la excitabilidad, manifestándose como una despolarización lenta (Cole y Nicoll, 1983; Madison y col., 1987; Pitler y Alger, 1990) o como una disminución de los potenciales postsinápticos excitadores y los potenciales postsinápticos provocados (Seeger y Alzheimer, 2001).

En definitiva, con estos experimentos demostramos que la activación de los receptores colinérgicos, tanto nicotínicos como muscarínicos, provoca un aumento en la excitabilidad de la red neuronal.

2. MCho ejerce su efecto a nivel presináptico.

Para evaluar si los efectos de la activación de los mAChRs se producen a nivel pre o postsináptico abordamos el problema desde varias perspectivas.

Para analizar si las proteínas G unidas a mAChRs postsinápticos pudiesen estar mediando la potenciación de las IPSCs provocadas por MCho, incluimos en la disolución intracelular la molécula GDP- β -S. Al ser un análogo no hidrolizable del GDP que compite con el GDP endógeno, impedimos que las proteínas G vuelvan a estar disponibles para ejercer su mecanismo de acción (Murayama y Ui, 1983; Hernandez-Guijo y col., 1999). Después de 3 minutos de diálisis intracelular, el tiempo requerido

para reemplazar todo el GDP endógeno (Elhamdani y col., 1995), observamos que no hay modificaciones en la potenciación de IPSCs por lo que podemos empezar a apuntar que el efecto de MCho no es a nivel postsináptico.

No obstante quisimos reflejar que MCho no estaba afectando a los receptores GABA_A directamente. Para ello procedimos a la aplicación de GABA exógeno aunque debemos considerar que estas I_{GABA} podrían estar asociadas parcialmente a receptores no sinápticos, con unas propiedades diferentes a los localizados sinápticamente. Efectivamente MCho no causa modificaciones significativas en la amplitud de las corrientes GABA_A, resultados que concuerdan con estudios previos (Ma y col., 2003).

Por otro lado, está claramente demostrado que la activación de los mAChRs presinápticos afecta a las mPSC excitadoras por una interferencia directa con los procesos de liberación de neurotransmisor en algún punto más allá del flujo de Ca²⁺ (Scanziani y col., 1995). Nuestros resultados, obtenidos por el estudio de las mPSCs tanto a potenciales de fijación de corriente de 0 mV como de -70 mV, muestra que el incremento de la frecuencia de los sucesos estocásticos inducidos por la aplicación de MCho no está acompañado por un cambio en la sensibilidad de la célula postsináptica a GABA, lo que se refleja en la ausencia de diferencias en la amplitud de las mPSCs.

Además el aumento de la frecuencia de las mPSCs es un claro indicativo de una acción presináptica. Aún así procedimos a un estudio de los parámetros biofísicos de éstas puesto que sólo se había efectuado con anterioridad en neuronas estriatales glutamatérgicas (Higley y col., 2009), mostrando que la activación de los mAChRs induce una disminución en la probabilidad de liberación y concentración de glutamato en la hendidura sináptica, reduciendo la duración de los potenciales sinápticos y limitando la sumación temporal de las entradas aferentes.

Como este efecto se produce en ausencia de un flujo importante de Ca²⁺, podríamos concluir que la activación presináptica de los mAChRs pudiese estar afectando a la liberación de neurotransmisor por algún mecanismo que parece ser independiente de la modulación de CCDV lo que implicaría una modulación directa de la maquinaria molecular subordinada al anclaje y fusión vesicular. No obstante más adelante en esta sección volveremos sobre este tema.

El compendio de estos datos sugiere una localización presináptica de los mAChRs, ya que estamos descartando cualquier posibilidad de efecto postsináptico.

3. Los receptores M2-M5 y sus mecanismos efectores son los responsables de la potenciación de IPSCs inducida por MCho.

Se han descrito 5 subtipos de mAChRs (Kubo y col., 1986; Bonner y col., 1987; Buckley y col., 1988; Caulfield y Birdsall, 1998). Los M1, M3 y M5 unen una proteína $G_{q/11}$ que activa una PLC (Exton, 1993) mientras que los M2 y M4 están acoplados a una proteína $G_{i/o}$ que inhibe una AC (Allen y Brown, 1993) y/o CCDV (Toselli y Lux, 1989).

Aunque los subtipos predominantes en el cerebro son los M1, M2 y M4 (Levey y col., 1991), los subtipos de mAChRs expresados en hipocampo son: M1 y M3 están expresados principalmente en los somas y dendritas de las células piramidales y granulares (Levey y col., 1995; Rouse y col., 1999; 2000); los M2 y M4 están localizados fundamentalmente en los procesos y cuerpos celulares de las interneuronas (Hajos y col., 1998); los receptores M5 parecen estar presentes en una concentración relativamente baja (Levey y col., 1995). Adicionalmente, un grupo de mAChRs presinápticos se encontraron en la ruta septo-hipocampal. Hay receptores M2 en los axones colinérgicos y M2-M4 en axones no colinérgicos (Levey y col., 1995). Aunque los mAChRs tienen muchos efectos fisiológicos, no está claro qué subtipo de receptores desempeñan cada una de las diferentes funciones. Por ejemplo, los receptores M2 y M4 inhiben la transmisión GABAérgica en médula espinal en ratones, mientras que la potencian en rata (Zhang y col., 2006). Por el contrario, los receptores M3 aumentan la liberación de GABA tanto en rata como en ratón (Zhang y col., 2005).

A través del uso de ligandos selectivos, encontramos que tanto M2 y M4 como M3 y M5 están involucrados en los efectos de MCho. Farmacológicamente descartamos los receptores M1, los más predominantes del cerebro humano (Flynn y col., 1995), de la potenciación generada por MCho en la transmisión GABAérgica. Cabe destacar que en publicaciones recientes se destaca que el subtipo de mAChRs M1 está expresado a una densidad muy baja, prácticamente indetectable, en varios subtipos de neuronas GABAérgicas y que éstos están preferentemente distribuidos en la membrana extrasináptica de las dendritas y espinas de las células piramidales (Yamasaki y col., 2010).

Los mecanismos responsables de estos eventos postsinápticos están causados por: (i) un incremento en la concentración de Ca^{2+} que ocurre por la activación de los receptores M3 y M5 con la subsecuente activación de una PLC, que conlleva a un

aumento en la concentración de IP_3 . Este segundo mensajero induce la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares (Young y col., 2005); (ii) una disminución de la conductancia de K^+ relacionada con la inhibición de los canales GIRK por la actividad de receptores acoplados a una proteína $G_{q/11}$, como los de la familia M2 (Wickman y Clapham, 1995; Dascal, 1997). La despolarización muscarínica también está relacionada con los receptores M1 (Dutar y Nicoll, 1988) pero el uso de ratones deficientes para este receptor demostró que el subtipo M1 no afecta a las conductancias de K^+ en el hipocampo (Rouse y col., 2000; Fisahn y col., 2002).

Un mecanismo complementario al descrito para la conductancia de iones implica a los M3 y M5 mediando la movilización de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, a través de la activación de la ruta PLC y la consecuente activación de los receptores IP_3 (Young y col., 2005). En apoyo a la presencia de este mecanismo mostramos que, tanto el inhibidor de la PLC (U73122) como el bloqueante de los receptores IP_3 (2-APB), suprimen el incremento en la frecuencia de disparo de las IPSCs provocada por el agonista de los mAChRs (MCho).

No obstante no queremos olvidar los mecanismos efectores desencadenados por la activación de los receptores acoplados a una proteína $G_{i/o}$. Es conocido que tanto la subunidad α de estas proteínas G como la subunidad β y γ modulan algunas conductancias iónicas (Guerineau y col., 1995) e inhiben la activación de CCDV (Toselli y Lux, 1989; Sahara y Westbrook, 1993), pero lo discutiremos mucho más profundamente en el siguiente bloque puesto que es imprescindible para una completa comprensión de los datos obtenidos en este trabajo de investigación (ver 2.3. de esta sección).

Por tanto, podemos concluir hasta aquí que aunque las interneuronas GABAérgicas componen menos del 15 % del total de la población neuronal en el hipocampo (Olbrich y Braak, 1985; Benson y col., 1994), éstas deben jugar un papel importante en la regulación de la excitabilidad y sincronización de la actividad neuronal. Hemos mostrado que la estimulación inducida por MCho de los receptores M2-M5, localizados presinápticamente en neuronas GABAérgicas, produce un pronunciado aumento de la frecuencia de IPSCs en neuronas de rata en cultivo. Los diferentes papeles y rutas señalizadoras de los subtipos de mAChRs podría ayudar a definir nuevas dianas terapéuticas con el ánimo de mejorar la neurotransmisión GABAérgica hipocampal. De este modo, agonistas selectivos de los mAChRs podrían potencialmente mejorar los procesos de aprendizaje y memoria en desordenes neurodegenerativos.

En este segundo bloque de resultados caracterizamos el efecto de la activación de los mAChRs sobre las sinapsis GABAérgicas. Evaluamos los efectos de la aplicación del agonista muscarínico MCho sobre las corrientes provocadas en autapsis GABAérgicas y glutamatérgicas y en fibras GABAérgicas aisladas. Vemos que MCho provoca una disminución de la probabilidad de liberación de neurotransmisor sin modificar el tamaño del contingente vesicular listo para ser liberado. Mostramos que esta disminución en la probabilidad de liberación de neurotransmisor justificaría los cambios observados en la plasticidad sináptica generados por diferentes protocolos de estimulación y que probablemente sea debida a una modulación de los CCDV. Pero no todos los datos obtenidos en este bloque pueden ser explicados por la modulación de CCDV por lo que la aplicación de trenes de estimulación a diferentes frecuencias nos da información relevante sobre los procesos de reciclado sináptico, concretamente la estimulación a frecuencias *theta* y *gamma*.

4. La activación de los mAChRs reduce las corrientes GABAérgicas generadas en autapsis y en fibras aisladas reduciendo la depresión por pares de pulsos.

El efecto ejercido por la activación de mAChRs sobre la transmisión sináptica es causa de controversia. Numerosos estudios reflejan una potenciación de las corrientes excitadoras (Benardo y Prince, 1982; Cole y Nicoll, 1983; Fernandez de Sevilla y Buno, 2010), sin embargo otros encuentran un incremento en las corrientes inhibitoras (Zhong y col., 2003) que debe estar asociado a una potenciación de la I_{GABA} (Ma y col., 2003) o a una postdespolarización que provoca el disparo de PAs (McQuiston y Madison, 1999a); en cualquier caso, este efecto no es mediado nunca por rutas excitadoras (Pitler y Alger, 1992; Widmer y col., 2006). Además, la inhibición de las corrientes excitadoras se asocia a una activación presináptica (Scanziani y col., 1995) o postsináptica (Seeger y Alzheimer, 2001) de los mAChRs. Otros autores indican que la activación de los mAChRs incrementa la frecuencia y amplitud de las IPSCs e inhiben la liberación de GABA (Behrends y ten Bruggencate, 1993). Estas discrepancias están asociadas a modificaciones ontogénicas en la excitabilidad neuronal y a cambios en el desarrollo y maduración de los receptores para neurotransmisor en diferentes estadios de desarrollo cerebral (Aronica y col., 2011).

Una forma de estudiar las sinapsis aisladas consiste en la generación de autapsis (Bekkers y Stevens, 1991). De esta forma conseguimos tener el componente presináptico y postsináptico en la misma célula, lo que permite estudiar células glutamatérgicas y GABAérgicas sin interferencia cruzada de otro neurotransmisor. En las interneuronas GABAérgicas observamos que MCho induce una rápida y potente disminución de la amplitud de las IPSCs. Por el contrario descartamos un efecto del agonista muscarínico sobre las células glutamatérgicas. El mismo efecto observado en autapsis lo corroboramos mediante otro modo de generar una IPSC, la estimulación de una fibra GABAérgica aislada.

De este modo realizamos un estudio de la relación de pares de pulsos, observando que MCho provoca la consabida disminución en la amplitud de la corriente del primer pulso pero capacita a la célula para una mejor respuesta al siguiente estímulo. Estos datos están apoyados en trabajos en los que un incremento en la relación de pares de pulsos inducida por la activación muscarínica viene acompañado de una disminución de las IPSCs (Salgado y col., 2007).

Entre los múltiples mecanismos conocidos que contribuyen a los cambios en la relación de pares de pulsos hay dos procesos de mayor importancia (Zucker y Regehr, 2002): (i) el Ca^{2+} residual del primer pulso causa un incremento en la probabilidad de liberación durante el segundo pulso aplicado a un intervalo corto; (ii) la depleción de vesículas sinápticas generada por el primer pulso posibilita una disminución en el número de vesículas listas para liberarse en el segundo estímulo.

5. La activación de los mAChRs facilita la respuesta de las sinapsis inhibitoras ante estímulos a frecuencia *theta* y *gamma*.

La aplicación de MCho previene la depresión ejercida por una breve estimulación tetánica a frecuencia *gamma* (40 Hz). Este efecto parece estar principalmente relacionado con la reducción en la probabilidad de liberación de neurotransmisor que reduce el grado de vaciamiento de vesículas sinápticas durante la estimulación tetánica, observándose a su vez un aumento en la I_{ss} al final del tren. La I_{ss} , tras un tren de 40 Hz con una duración de 1 s, se caracteriza por un equilibrio entre la liberación y el reciclaje de vesículas (Schneggenburger y col., 1999). Por otro lado observamos que cuando la fibra presináptica es estimulada con un tren sostenido a frecuencia *theta* (8 Hz), MCho reduce

el grado de depresión sináptica e incrementa la corriente estacionaria en la última parte del tren. Este efecto no puede ser explicado completamente por la reducción de la probabilidad de liberación, probablemente a consecuencia de la disminución del flujo de Ca^{2+} como discutiremos en profundidad en el siguiente apartado. Por tanto los cambios en la depresión sináptica deben de ser dependientes de la eficiencia de los procesos de reciclado vesicular en el terminal presináptico (Zucker y Regehr, 2002).

Consecuentemente, cuando la frecuencia de estimulación regresa a frecuencias bajas, MCho incrementa el grado de recuperación desde la depresión inducida por los trenes *theta* y *gamma*. Esto representa otro claro indicativo de que la activación de los mAChRs incrementa la velocidad de reciclado vesicular tras un periodo de intensa actividad.

Numerosas evidencias indican que el ritmo *theta* (4-8 Hz) está directamente involucrado en funciones mnemónicas en el hipocampo (Vertes y Kocsis, 1997; O'Keefe y Burgess, 1999; Hasselmo, 2000; Hasselmo y col., 2002; Kirk y Mackay, 2003; Vertes y col., 2004). De hecho el aprendizaje está potenciado cuando el estímulo se presenta en periodos de ritmo *theta* (Griffin y col., 2004). Las interneuronas hipocampales juegan un importante papel en la generación de esta oscilación de la red neuronal (Klausberger y col., 2003). La modulación colinérgica despolariza directamente las interneuronas hipocampales (Chapman y Lacaille, 1999; McQuiston y Madison, 1999a; Alkondon y Albuquerque, 2001) aunque la activación muscarínica también reduce la liberación de GABA (Pitler y Alger, 1992). Esta modulación colinérgica de la oscilación de las interneuronas contribuye a la regulación de la codificación y de las dinámicas de recuperación en el hipocampo. Un ejemplo es la despolarización mediada por mAChRs de las interneuronas del *stratum lacunosum moleculare* pero no del resto de células de esta capa del hipocampo (Lawrence y col., 2006). Esta separación espacial provocaría una diferenciación en las oscilaciones a nivel dendrítico y somático que permitiría codificar la información por un lado y potenciar las dinámicas de recuperación por otro (Hasselmo y col., 2002; Kunec y col., 2005).

El fuerte efecto de MCho sobre los procesos de reciclado vesicular nos ayuda a reconciliar una inconsistencia entre la fuerte inhibición de las IPSCs y el incremento en la frecuencia de mPSCs. A pesar de la supresión general de los CCDV (ver a continuación) MCho aumenta paradójicamente los niveles de Ca^{2+} intracelular en dendritas y espinas sinápticas tanto por un bloqueo de corrientes de K^+ como por la liberación de Ca^{2+} de

depósitos intracelulares (Muller y Connor, 1991; Beier y Barish, 2000). Por otra parte se conoce que el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta significativamente la velocidad de reciclado vesicular (Marks y McMahon, 1998; Beutner y col., 2001) proporcionando un mecanismo adicional para sostener mejor la actividad sináptica persistente y de alta frecuencia.

6. MChO inhibe selectivamente los CCDV implicados en la liberación de GABA.

La activación de los mAChRs afecta individualmente a las neuronas por influencia en algunos tipos de corrientes iónicas: la corriente M (Adams y col., 1982), la corriente de fuga de K^+ (Madison y col., 1987), la corriente de K^+ lenta activada por Ca^{2+} (Cole y Nicoll, 1984), corrientes generadas en canales SK (Giessel y Sabatini, 2010), la corriente catiónica no selectiva activada por Ca^{2+} (Guerineau y col., 1995) y los CCDV (Toselli y Lux, 1989; Howe y Surmeier, 1995). Tanto los mecanismos presinápticos como los postsinápticos provocados por la activación muscarínica están asociados con postdespolarizaciones en las interneuronas (McQuiston y Madison, 1999a) y por inhibición de los CCDV (Salgado y col., 2007). Además, la reducción de las corrientes excitadoras en hipocampo por activación presináptica de mAChRs no está mediada por inhibición de los CCDV, sino por una interferencia directa en algún punto de los procesos de liberación de neurotransmisor consecuente al flujo de Ca^{2+} (Sanziani y col., 1995).

La inhibición de los CCDV por agonistas muscarínicos se conoce en varios tipos neuronales (Mathie y col., 1992; Allen y Brown, 1993; Liu y col., 2002). El estudio de los CCDV se ha centrado principalmente sobre los canales de tipo no-L (Jeong y Wurster, 1997; Delmas y col., 1998; Stewart y col., 1999; Liu y col., 2002) a través de la activación de la enzima PI3K de un modo independiente de Ca^{2+} y de la enzima PKC dependiente de la actividad de PLC que a su vez es activada por Ca^{2+} (Salgado y col., 2007).

Los canales más participativos en la liberación de GABA en las neuronas de hipocampo son los de tipo-N y tipo-P/Q (Baldelli y col., 2005). En nuestro estudio mostramos que los canales somáticos de tipo-N y tipo-P/Q son más sensibles que los de tipo-L y tipo-R a modulación muscarínica. Este resultado fue confirmado cuando medimos la contribución de los diferentes subtipos de CCDV presinápticos sobre la generación de IPSCs en condiciones control y después del tratamiento con MChO.

Observamos que MChO ejerce una inhibición selectiva sobre los CCDV de tipo-N y tipo-P/Q, mientras que los tipo-R, debido a su insensibilidad a la activación de los mAChRs, se convierte en la principal fuente de Ca^{2+} que conduce a la liberación de GABA en las células tratadas con MChO.

Se ha demostrado que esta inhibición es mediada por la activación de una proteína G sensible a toxina *pertusis* (Toselli y col., 1989; Jeong y Wurster, 1997), relacionada con la familia M2 (Allen y Brown, 1993; Liu y col., 2002). La inhibición de los CCDV se ejerce directamente por mediación de la subunidad $\beta\gamma$ (Campbell y col., 1995; Herlitze y col., 1996; Ikeda, 1996). Es importante reseñar que fuertes pulsos despolarizantes (Hernandez-Guijo y col., 1998) o estimulaciones a alta frecuencia (Brody y Yue, 2000) liberan la unión de la subunidad $\beta\gamma$ del canal de Ca^{2+} (Brody y Yue, 2000) permitiendo la recuperación de las corrientes de Ca^{2+} inhibidas por la activación de mAChRs. Es particularmente interesante mencionar aquí que la recuperación de la conductancia de los CCDV de tipo-N y tipo-P/Q podría contribuir a la reducción de la depresión sináptica que observamos en las sinapsis GABAérgicas tratadas con MChO cuando las sometemos a periodos de estimulación a frecuencia *theta* y *gamma*.

Una de las características dinámicas intrínsecas a las sinapsis es que pueden funcionar como filtros. Las sinapsis con una probabilidad inicial de liberación de neurotransmisor baja pueden funcionar como filtros altos, mientras que las sinapsis con una alta probabilidad de liberación inicial alta pueden actuar como filtros bajos (Abbott y Regehr, 2004). Ejemplos de filtros bajos los encontramos en varias sinapsis inhibitoras del SNC, incluido el neocórtex (Gupta y col., 2000) y el hipocampo (Poncer y col., 2000; Hefft y col., 2002). Nuestros resultados indican que bajo condiciones control las neuronas inhibitoras muestran una rápida y pronunciada depresión sináptica, típica de un filtro bajo. La activación de los mAChRs por MChO disminuye la probabilidad de liberación de GABA e incrementa la velocidad de reciclado vesicular de las sinapsis inhibitoras hipocampales, cambiando de este modo sus propiedades dinámicas de filtro e incrementando su frecuencia tope. Estas propiedades son de particular interés a la luz de los mecanismos básicos envueltos en la oscilación *gamma* hipocampal. Es más, las oscilaciones *gamma* (30-90 Hz) son inducidas por agonistas muscarínicos que mimetizan las entradas colinérgicas desde el *septum* medial y son completamente bloqueadas por antagonistas de los receptores GABA_A (Bartos y col., 2007). Esto enfatiza el significado

de la modulación muscarínica de las sinapsis GABAérgicas en la generación de las oscilaciones *gamma*.

Las oscilaciones de la red neuronal en el rango de la frecuencia *gamma* (30-90 Hz) provee de una estructura temporal a los procesos cognitivos de atención selectiva (Fries y col., 2001) y consciencia (Llinas y col., 1998). También se propone que la actividad *gamma* hipocampal está involucrada en procesos de generación de memoria (Jensen y col., 1996) que pueden estar inducidos por activación de los mAChRs (Fisahn y col., 1998; Fellous y Sejnowski, 2000), que en gran parte activan interneuronas GABAérgicas (Fisahn y col., 1998; Traub y col., 2002). La influencia de los mAChRs sobre los procesos cognitivos no está muy bien comprendida, pero sí que están identificados una gran variedad de sus efectos: la activación de algunas cascadas de segundos mensajeros (McKinney, 1993); la modulación de corrientes postsinápticas (Cole y Nicoll, 1983; Toselli y col., 1989; Krnjevic, 1993); la inhibición de la liberación de neurotransmisor (Raiteri y col., 1984; Pohorecki y col., 1988; Marchi y Raiteri, 1989; Raiteri y col., 1990); el incremento de la respuesta de los receptores NMDA de glutamato (Markram y Segal, 1990); y la modulación de la LTP y LTD (Blitzer y col., 1990; Markram y Segal, 1990; Williams y Johnston, 1990; Pang y col., 1993). Por estas razones es de particular interés caracterizar en detalle el impacto de los mAChRs sobre la función del sistema GABAérgico hipocampal. La mayoría de las neuronas GABAérgicas expresan mAChRs (Van der Zee y Luiten, 1993) y su activación induce cambios en el V_m provocando el disparo de PAs (Widmer y col., 2006). Estas interneuronas contactan sobre neuronas piramidales pero también sobre otras interneuronas (Gulyas y col., 1996; Freund y Gulyas, 1997). Por tanto, los fármacos que modifiquen la liberación de GABA actuando sobre los mAChRs mostrarán dramáticos efectos sobre la excitabilidad de la red neuronal.

En resumen, nuestros resultados muestran que la modulación muscarínica de la transmisión GABAérgica en el hipocampo ejerce una doble acción: una disminución en la amplitud de las IPSCs debido a una disminución en la probabilidad de liberación de neurotransmisor combinado con un refuerzo de los procesos de reciclado vesicular. Estas características afectan a las propiedades plásticas a corto plazo de las sinapsis inhibitoras cambiando las dinámicas de las mismas hacia una configuración funcional completamente diferente.

CONCLUSIONES

- a) El agonista muscarínico metacolina es capaz de aumentar la excitabilidad de las células GABAérgicas sin afectar a las células glutamatérgicas.
- b) Los receptores metabotrópicos de acetilcolina M2, M3, M4 y M5 están implicados en la potenciación de la transmisión GABAérgica y se localizan a nivel presináptico.
- c) Metacolina disminuye la probabilidad de liberación de GABA sin modificar el tamaño del contingente vesicular listo para ser liberado.
- d) Los canales de calcio dependientes de voltaje responsables de la neurotransmisión GABAérgica (tipo-N y -P/Q) ven disminuida su conductancia en presencia de metacolina.
- e) La activación de los receptores muscarínicos cambia las propiedades dinámicas de la sinapsis GABAérgica preparándola para una actuación prolongada más eficaz.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott LF y Regehr WG. (2004). Synaptic computation. *Nature* **431**, 796-803.
- Adams PR, Brown DA y Constanti A. (1982). M-currents and other potassium currents in bullfrog sympathetic neurones. *J Physiol* **330**, 537-572.
- Adams SV, Winterer J y Muller W. (2004). Muscarinic signaling is required for spike-pairing induction of long-term potentiation at rat Schaffer collateral-CA1 synapses. *Hippocampus* **14**, 413-416.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M y Rogers SW. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **89**, 73-120.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Schratzenholz A y Maelicke A. (1997). Nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal neurons: distribution on the neuronal surface and modulation of receptor activity. *J Recept Signal Transduct Res* **17**, 243-266.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Castro NG, Alkondon M, Reinhardt S, Schroder H y Maelicke A. (1995). Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* **757**, 48-72.
- Alkondon M y Albuquerque EX. (2001). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and alpha4beta2 subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus. *J Neurophysiol* **86**, 3043-3055.
- Alkondon M, Pereira EF y Albuquerque EX. (1998). alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res* **810**, 257-263.
- Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT y Albuquerque EX. (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* **283**, 1396-1411.
- Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM y Albuquerque EX. (1999). Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci* **19**, 2693-2705.
- Álvarez-Leefmans FJ. (1990). Intracellular Cl⁻ regulation and synaptic inhibition invertebrate and invertebrate neurons. In *Chloride channels and carriers in nerve, muscle and glial cells*, ed. F. J. Álvarez-Leefmans y J. M. Russell, pp. 109-150. Plenum Press, New York.
- Allen TG y Brown DA. (1993). M2 muscarinic receptor-mediated inhibition of the Ca²⁺ current in rat magnocellular cholinergic basal forebrain neurones. *J Physiol* **466**, 173-189.
- Amaral DG. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* **182**, 851-914.
- Angevine JB. (1975). Development of the hippocampal region. En: *The hippocampus*. Vol. I. Eds. Isaacson, R.L. and Pribram, K.H. Plenum, NY. p61-94.
- Angevine JB, Jr. (1965). Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl*, Suppl 2:1-70.
- Anglister L, Stiles JR y Salpeter MM. (1994). Acetylcholinesterase density and turnover number at frog neuromuscular junctions, with modeling of their role in synaptic function. *Neuron* **12**, 783-794.
- Anwar J, Spanevello RM, Thome G, Stefanello N, Schmatz R, Gutierrez J, Vieira J, Baldissarelli J, Carvalho FB, da Rosa MM, Rubin MA, Fiorenza A, Morsch VM y Schetinger MR. (2012). Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* **103**, 386-394.

- Apartis E, Poindessous-Jazat FR, Lamour YA y Bassant MH. (1998). Loss of rhythmically bursting neurons in rat medial septum following selective lesion of septohippocampal cholinergic system. *J Neurophysiol* **79**, 1633-1642.
- Aramakis VB y Metherate R. (1998). Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex. *J Neurosci* **18**, 8485-8495.
- Arnaiz-Cot JJ, Gonzalez JC, Sobrado M, Baldelli P, Carbone E, Gandia L, Garcia AG y Hernandez-Guijo JM. (2008). Allosteric modulation of alpha 7 nicotinic receptors selectively depolarizes hippocampal interneurons, enhancing spontaneous GABAergic transmission. *Eur J Neurosci* **27**, 1097-1110.
- Aronica E, Iyer A, Zurolo E y Gorter JA. (2011). Ontogenetic modifications of neuronal excitability during brain maturation: developmental changes of neurotransmitter receptors. *Epilepsia* **52 Suppl 8**, 3-5.
- Baldelli P, Hernandez-Guijo JM, Carabelli V y Carbone E. (2005). Brain-derived neurotrophic factor enhances GABA release probability and nonuniform distribution of N- and P/Q-type channels on release sites of hippocampal inhibitory synapses. *J Neurosci* **25**, 3358-3368.
- Baldelli P, Novara M, Carabelli V, Hernandez-Guijo JM y Carbone E. (2002). BDNF up-regulates evoked GABAergic transmission in developing hippocampus by potentiating presynaptic N- and P/Q-type Ca²⁺ channels signalling. *Eur J Neurosci* **16**, 2297-2310.
- Barker JL y Harrison NL. (1988). Outward rectification of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* **403**, 41-55.
- Bartos M, Vida I y Jonas P. (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* **8**, 45-56.
- Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B y Lippa AS. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408-414.
- Beatty WW, Butters N y Janowsky DS. (1986). Patterns of memory failure after scopolamine treatment: implications for cholinergic hypotheses of dementia. *Behav Neural Biol* **45**, 196-211.
- Behrends JC y ten Bruggencate G. (1993). Cholinergic modulation of synaptic inhibition in the guinea pig hippocampus in vitro: excitation of GABAergic interneurons and inhibition of GABA-release. *J Neurophysiol* **69**, 626-629.
- Beier SM y Barish ME. (2000). Cholinergic stimulation enhances cytosolic calcium ion accumulation in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones during short action potential trains. *J Physiol* **526 Pt 1**, 129-142.
- Bekkers JM y Stevens CF. (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7834-7838.
- Bellier JP y Kimura H. (2011). Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. *J Chem Neuroanat* **42**, 225-235.
- Ben-Ari Y, Tseeb V, Ragozzino D, Khazipov R y Gaiarsa JL. (1994). gamma-Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog Brain Res* **102**, 261-273.
- Benardo LS y Prince DA. (1982). Cholinergic excitation of mammalian hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* **249**, 315-331.
- Benson DL, Watkins FH, Steward O y Banker G. (1994). Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *J Neurocytol* **23**, 279-295.

- Berke JD, Okatan M, Skurski J y Eichenbaum HB. (2004). Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron* **43**, 883-896.
- Berridge MJ. (1995). Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Ann N Y Acad Sci* **766**, 31-43.
- Beutner D, Voets T, Neher E y Moser T. (2001). Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron* **29**, 681-690.
- Blackstad TW. (1956). Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol* **105**, 417-537.
- Blackstad TW, Brink K, Hem J y Jeune B. (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* **138**, 433-449.
- Blitzer RD, Gil O y Landau EM. (1990). Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett* **119**, 207-210.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC y Brann MR. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**, 527-532.
- Bonner TI, Young AC, Brann MR y Buckley NJ. (1988). Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**, 403-410.
- Bourne HR, Sanders DA y McCormick F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.
- Bouron A y Reuter H. (1999). The D1 dopamine receptor agonist SKF-38393 stimulates the release of glutamate in the hippocampus. *Neuroscience* **94**, 1063-1070.
- Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K y Buzsaki G. (1995). Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* **15**, 47-60.
- Brankack J, Platt B y Riedel G. (2009). Sleep and hippocampus: do we search for the right things? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**, 806-812.
- Brody DL y Yue DT. (2000). Relief of G-protein inhibition of calcium channels and short-term synaptic facilitation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 889-898.
- Broide RS y Leslie FM. (1999). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* **20**, 1-16.
- Brown TH y Zador A. (1990). The hippocampus. In *The Synaptic Organization of the Brain*, ed. G. M. Shepherd, pp. 346-388. Oxford University Press, New York.
- Buckley NJ, Bonner TI y Brann MR. (1988). Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* **8**, 4646-4652.
- Buckley NJ, Bonner TI, Buckley CM y Brann MR. (1989). Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* **35**, 469-476.
- Buzsaki G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* **33**, 325-340.
- Buzsaki G, Leung LW y Vanderwolf CH. (1983). Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* **287**, 139-171.
- Callahan MJ, Kinsora JJ, Harbaugh RE, Reeder TM y Davis RE. (1993). Continuous ICV infusion of scopolamine impairs sustained attention of rhesus monkeys. *Neurobiol Aging* **14**, 147-151.

- Campbell V, Berrow NS, Fitzgerald EM, Brickley K y Dolphin AC. (1995). Inhibition of the interaction of G protein G(o) with calcium channels by the calcium channel beta-subunit in rat neurones. *J Physiol* **485** (Pt 2), 365-372.
- Cardinali DP. (1992). Manual de Neurofisiología. Ediciones Diaz de Santos.
- Castro NG y Albuquerque EX. (1995). alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J* **68**, 516-524.
- Caulfield MP y Birdsall NJ. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**, 279-290.
- Clapham DE y Neer EJ. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 167-203.
- Cole AE y Nicoll RA. (1983). Acetylcholine mediates a slow synaptic potential in hippocampal pyramidal cells. *Science* **221**, 1299-1301.
- Cole AE y Nicoll RA. (1984). The pharmacology of cholinergic excitatory responses in hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* **305**, 283-290.
- Colino A y Halliwell JV. (1993). Carbachol potentiates Q current and activates a calcium-dependent non-specific conductance in rat hippocampus in vitro. *Eur J Neurosci* **5**, 1198-1209.
- Collingridge GL, Gage PW y Robertson B. (1984). Inhibitory post-synaptic currents in rat hippocampal CA1 neurones. *J Physiol* **356**, 551-564.
- Crow TJ y Grove-White IG. (1973). An analysis of the learning deficit following hyoscine administration to man. *Br J Pharmacol* **49**, 322-327.
- Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novere N, McIntosh JM, Gardier AM y Changeux JP. (2003). Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* **23**, 7820-7829.
- Chapman CA y Lacaille JC. (1999). Cholinergic induction of theta-frequency oscillations in hippocampal inhibitory interneurons and pacing of pyramidal cell firing. *J Neurosci* **19**, 8637-8645.
- Chen C y Regehr WG. (1997). The mechanism of cAMP-mediated enhancement at a cerebellar synapse. *J Neurosci* **17**, 8687-8694.
- Cherubini E, Gaiarsa JL y Ben-Ari Y. (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* **14**, 515-519.
- Christopoulos A. (2007). Muscarinic Acetylcholine Receptors in the central nervous system: structure, function and pharmacology. En: Karczmar, A. G. ed. Exploring the Vertebrate Central Cholinergic Nervous System. New York p163-208.
- Chrobak JJ y Buzsaki G. (1998). Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J Neurosci* **18**, 388-398.
- Dani JA y Bertrand D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**, 699-729.
- Dascal N. (1997). Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell Signal* **9**, 551-573.
- Davies P y Maloney AJ. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**, 1403.
- Decker MW y McGaugh JL. (1991). The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* **7**, 151-168.

- Defer N, Best-Belpomme M y Hanoune J. (2000). Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F400-416.
- Delmas P, Abogadie FC, Dayrell M, Haley JE, Milligan G, Caulfield MP, Brown DA y Buckley NJ. (1998). G-proteins and G-protein subunits mediating cholinergic inhibition of N-type calcium currents in sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* **10**, 1654-1666.
- Delpire E. (2000). Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* **15**, 309-312.
- Detari L. (2000). Tonic and phasic influence of basal forebrain unit activity on the cortical EEG. *Behav Brain Res* **115**, 159-170.
- Dimyan MA y Weinberger NM. (1999). Basal forebrain stimulation induces discriminative receptive field plasticity in the auditory cortex. *Behav Neurosci* **113**, 691-702.
- Drachman DA y Leavitt J. (1974). Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* **30**, 113-121.
- Dutar P, Bassant MH, Senut MC y Lamour Y. (1995). The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol Rev* **75**, 393-427.
- Dutar P y Nicoll RA. (1988). Classification of muscarinic responses in hippocampus in terms of receptor subtypes and second-messenger systems: electrophysiological studies in vitro. *J Neurosci* **8**, 4214-4224.
- Eglen RM, Choppin A y Watson N. (2001). Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 409-414.
- Ehrlich I, Lohrke S y Friauf E. (1999). Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action in rat auditory neurones is due to age-dependent Cl⁻ regulation. *J Physiol* **520 Pt 1**, 121-137.
- Elhamdani A, Bossu JL y Feltz A. (1995). ATP and G proteins affect the runup of the Ca²⁺ current in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch* **430**, 410-419.
- Engel AK, Fries P y Singer W. (2001). Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci* **2**, 704-716.
- Engelman HS y MacDermott AB. (2004). Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci* **5**, 135-145.
- Everitt BJ y Robbins TW. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* **48**, 649-684.
- Exton JH. (1993). Role of G proteins in activation of phosphoinositide phospholipase C. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **28**, 65-72.
- Exton JH. (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 481-509.
- Felder CC. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *Faseb J* **9**, 619-625.
- Fellous JM y Sejnowski TJ. (2000). Cholinergic induction of oscillations in the hippocampal slice in the slow (0.5-2 Hz), theta (5-12 Hz), and gamma (35-70 Hz) bands. *Hippocampus* **10**, 187-197.
- Fernandez de Sevilla D y Buno W. (2010). The muscarinic long-term enhancement of NMDA and AMPA receptor-mediated transmission at Schaffer collateral synapses develop through different intracellular mechanisms. *J Neurosci* **30**, 11032-11042.

- Fibiger HC. (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci* **14**, 220-223.
- Fisahn A, Pike FG, Buhl EH y Paulsen O. (1998). Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* **394**, 186-189.
- Fisahn A, Yamada M, Duttaroy A, Gan JW, Deng CX, McBain CJ y Wess J. (2002). Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents. *Neuron* **33**, 615-624.
- Flynn DD, Ferrari-DiLeo G, Mash DC y Levey AI. (1995). Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **64**, 1888-1891.
- Frazier CJ, Buhler AV, Weiner JL y Dunwiddie TV. (1998a). Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J Neurosci* **18**, 8228-8235.
- Frazier CJ, Rollins YD, Breese CR, Leonard S, Freedman R y Dunwiddie TV. (1998b). Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J Neurosci* **18**, 1187-1195.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG y Schioth HB. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272.
- Freund TF y Buzsaki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347-470.
- Freund TF y Gulyas AI. (1997). Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* **75**, 479-487.
- Frey U, Huang YY y Kandel ER. (1993). Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* **260**, 1661-1664.
- Fries P. (2005). A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn Sci* **9**, 474-480.
- Fries P. (2009). Neuronal gamma-band synchronization as a fundamental process in cortical computation. *Annu Rev Neurosci* **32**, 209-224.
- Fries P, Reynolds JH, Rorie AE y Desimone R. (2001). Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* **291**, 1560-1563.
- Frotscher M y Laranth C. (1985). Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* **239**, 237-246.
- Frotscher M, Schlandler M y Laranth C. (1986). Cholinergic neurons in the hippocampus. A combined light- and electron-microscopic immunocytochemical study in the rat. *Cell Tissue Res* **246**, 293-301.
- Fujii S, Ji Z, Morita N y Sumikawa K. (1999). Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP. *Brain Res* **846**, 137-143.
- Gaarskjaer FB. (1986). The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res* **396**, 335-357.
- Galvani L. (1791). De viribus electritatis in motu musculari commentarius. *Bon Sci Art Inst Acad Comm* **7**, 363-418.

- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST y Poo M. (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* **105**, 521-532.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R y Garcia-Sancho J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* **86**, 1093-1131.
- Garduno J, Galindo-Charles L, Jimenez-Rodriguez J, Galarraga E, Tapia D, Mihailescu S y Hernandez-Lopez S. (2012). Presynaptic alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* **32**, 15148-15157.
- Gautam D, Duttaroy A, Cui Y, Han SJ, Deng C, Seeger T, Alzheimer C y Wess J. (2006). M1-M3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice: novel phenotypes. *J Mol Neurosci* **30**, 157-160.
- Ge S y Dani JA. (2005). Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation. *J Neurosci* **25**, 6084-6091.
- Giessel AJ y Sabatini BL. (2010). M1 muscarinic receptors boost synaptic potentials and calcium influx in dendritic spines by inhibiting postsynaptic SK channels. *Neuron* **68**, 936-947.
- Givens B y Olton DS. (1994). Local modulation of basal forebrain: effects on working and reference memory. *J Neurosci* **14**, 3578-3587.
- Gotti C y Clementi F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* **74**, 363-396.
- Gray CM. (1994). Synchronous oscillations in neuronal systems: mechanisms and functions. *J Comput Neurosci* **1**, 11-38.
- Gray CM, Konig P, Engel AK y Singer W. (1989). Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature* **338**, 334-337.
- Griffin AL, Asaka Y, Darling RD y Berry SD. (2004). Theta-contingent trial presentation accelerates learning rate and enhances hippocampal plasticity during trace eyeblink conditioning. *Behav Neurosci* **118**, 403-411.
- Grigoryan GA, Peters S, Gray JA y Hodges H. (1994). Interactions between the effects of propranolol and nicotine on radial maze performance of rats with lesions of the forebrain cholinergic projection system. *Behav Pharmacol* **5**, 265-280.
- Guerineau NC, Bossu JL, Gahwiler BH y Gerber U. (1995). Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* **15**, 4395-4407.
- Gulyas AI, Hajos N y Freund TF. (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* **16**, 3397-3411.
- Guo JZ, Tredway TL y Chiappinelli VA. (1998). Glutamate and GABA release are enhanced by different subtypes of presynaptic nicotinic receptors in the lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* **18**, 1963-1969.
- Gupta A, Wang Y y Markram H. (2000). Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* **287**, 273-278.
- Hahn T, Desoye G, Lang I y Skofitsch G. (1993). Location and activities of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the rat and human placenta. *Anat Embryol (Berl)* **188**, 435-440.
- Hajos N, Papp EC, Acsady L, Levey AI y Freund TF. (1998). Distinct interneuron types express m2 muscarinic receptor immunoreactivity on their dendrites or axon terminals in the hippocampus. *Neuroscience* **82**, 355-376.

- Hajos N y Paulsen O. (2009). Network mechanisms of gamma oscillations in the CA3 region of the hippocampus. *Neural Netw* **22**, 1113-1119.
- Halgren E, Babb TL y Crandall PH. (1977). Post-EEG seizure depression of human limbic neurons is not determined by their response to probable hypoxia. *Epilepsia* **18**, 89-93.
- Halliwel JV. (1990). Physiological mechanisms of cholinergic action in the hippocampus. *Prog Brain Res* **84**, 255-272.
- Hamill OP, Bormann J y Sakmann B. (1983). Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA. *Nature* **305**, 805-808.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B y Sigworth FJ. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.
- Hanoune J y Defer N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145-174.
- Hardman JG, Limbird LE y Godman Gilman A. (2001). Neurotransmission. En: Godman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 10th edition. The McGraw Hill Companies Inc. p115-154.
- Harris E, Witter MP, Weinstein G y Stewart M. (2001). Intrinsic connectivity of the rat subiculum: I. Dendritic morphology and patterns of axonal arborization by pyramidal neurons. *J Comp Neurol* **435**, 490-505.
- Hasselmo ME. (1999). Neuromodulation and the hippocampus: memory function and dysfunction in a network simulation. *Prog Brain Res* **121**, 3-18.
- Hasselmo ME. (2000). Septal modulation of hippocampal dynamics: what is the function of the theta rhythm? In *The behavioral neuroscience of the septal region*, ed. R. Numan, pp. 92-114. Springer-Verlag., New York.
- Hasselmo ME, Bodelon C y Wyble BP. (2002). A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Comput* **14**, 793-817.
- Hefft S, Hulo S, Bertrand D y Muller D. (1999). Synaptic transmission at nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal organotypic cultures and slices. *J Physiol* **515 (Pt 3)**, 769-776.
- Hefft S, Kraushaar U, Geiger JR y Jonas P. (2002). Presynaptic short-term depression is maintained during regulation of transmitter release at a GABAergic synapse in rat hippocampus. *J Physiol* **539**, 201-208.
- Heinrich JN, Butera JA, Carrick T, Kramer A, Kowal D, Lock T, Marquis KL, Pausch MH, Popielek M, Sun SC, Tseng E, Uveges AJ y Mayer SC. (2009). Pharmacological comparison of muscarinic ligands: historical versus more recent muscarinic M1-preferring receptor agonists. *Eur J Pharmacol* **605**, 53-56.
- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T y Catterall WA. (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 258-262.
- Hernandez-Guijo JM, Carabelli V, Gandia L, Garcia AG y Carbone E. (1999). Voltage-independent autocrine modulation of L-type channels mediated by ATP, opioids and catecholamines in rat chromaffin cells. *Eur J Neurosci* **11**, 3574-3584.
- Hernandez-Guijo JM, Gandia L, Lara B y Garcia AG. (1998). Autocrine/paracrine modulation of calcium channels in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch* **437**, 104-113.

- Higley MJ, Soler-Llavina GJ y Sabatini BL. (2009). Cholinergic modulation of multivesicular release regulates striatal synaptic potency and integration. *Nat Neurosci* **12**, 1121-1128.
- Hjorth-Simonsen A. (1972). Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata. *J Comp Neurol* **146**, 219-232.
- Hjorth-Simonsen A. (1973). Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis. *J Comp Neurol* **147**, 145-161.
- Hodgkin AL y Huxley AF. (1939). Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature* **144**, 710-711.
- Hogg RC, Raggenbass M y Bertrand D. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **147**, 1-46.
- Horn R y Marty A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* **92**, 145-159.
- Howe AR y Surmeier DJ. (1995). Muscarinic receptors modulate N-, P-, and L-type Ca²⁺ currents in rat striatal neurons through parallel pathways. *J Neurosci* **15**, 458-469.
- Huerta PT y Lisman JE. (1993). Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature* **364**, 723-725.
- Huerta PT y Lisman JE. (1995). Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron* **15**, 1053-1063.
- Ikeda SR. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 255-258.
- Ira FS. (2008). *Fisiología Humana. Décima Edición. Mc Graw Hill eds. p182-190.*
- Isaacson RL. (1987). Hippocampus. En: Encyclopedia of Neurosciences, Vol. I. Ed. Adelman, G. Birkhauser, Basel, p492-495.
- Ishizuka N, Weber J y Amaral DG. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* **295**, 580-623.
- Izquierdo I. (1989). Mechanism of action of scopolamine as an amnestic. *Trends Pharmacol Sci* **10**, 175-177.
- Jensen O, Idiart MA y Lisman JE. (1996). Physiologically realistic formation of autoassociative memory in networks with theta/gamma oscillations: role of fast NMDA channels. *Learn Mem* **3**, 243-256.
- Jeong SW y Wurster RD. (1997). Muscarinic receptor activation modulates Ca²⁺ channels in rat intracardiac neurons via a PTX- and voltage-sensitive pathway. *J Neurophysiol* **78**, 1476-1490.
- Ji D y Dani JA. (2000). Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* **83**, 2682-2690.
- Johnston D y Brown TH. (1983). Interpretation of voltage-clamp measurements in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **50**, 464-486.
- Jones S y Yakel JL. (1997). Functional nicotinic ACh receptors on interneurons in the rat hippocampus. *J Physiol* **504** (Pt 3), 603-610.
- Kahle W, Leonhardt H y Platzer W. (1988). Atlas de anatomia. Tomo 3: Sistema nervioso y organos de los sentidos. Werner Kahle. Ediciones Omega Barcelona.

- Kaila K, Pasternack M, Saarikoski J y Voipio J. (1989). Influence of GABA-gated bicarbonate conductance on potential, current and intracellular chloride in crayfish muscle fibres. *J Physiol* **416**, 161-181.
- Kandel ER y Schwartz JH. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* **218**, 433-443.
- Karlin A, Cox RN, Dipaola M, Holtzman E, Kao PN, Lobel P, Wang L y Yodh N. (1986). Functional domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci* **463**, 53-69.
- Kimura F. (2000). Cholinergic modulation of cortical function: a hypothetical role in shifting the dynamics in cortical network. *Neurosci Res* **38**, 19-26.
- Kirk IJ y Mackay JC. (2003). The role of theta-range oscillations in synchronising and integrating activity in distributed mnemonic networks. *Cortex* **39**, 993-1008.
- Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsaki G y Somogyi P. (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* **421**, 844-848.
- Krnjevic K. (1993). Central cholinergic mechanisms and function. *Prog Brain Res* **98**, 285-292.
- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K y et al. (1986). Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **323**, 411-416.
- Kunec S, Hasselmo ME y Kopell N. (2005). Encoding and retrieval in the CA3 region of the hippocampus: a model of theta-phase separation. *J Neurophysiol* **94**, 70-82.
- Laatsch RH y Cowan WM. (1966). Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization. *J Comp Neurol* **128**, 359-395.
- Lalli E y Sassone-Corsi P. (1994). Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* **269**, 17359-17362.
- Lane RM, Potkin SG y Enz A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* **9**, 101-124.
- Langley JN. (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol* **33**, 374-413.
- Lanzafame AA, Christopoulos A y Mitchelson F. (2003). Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels* **9**, 241-260.
- Laurent G. (2002). Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nat Rev Neurosci* **3**, 884-895.
- Lawrence JJ, Statland JM, Grinspan ZM y McBain CJ. (2006). Cell type-specific dependence of muscarinic signalling in mouse hippocampal stratum oriens interneurons. *J Physiol* **570**, 595-610.
- LeBlanc CJ, Deacon TW, Whatley BR, Dinsmore J, Lin L y Isacson O. (1999). Morris water maze analysis of 192-IgG-saporin-lesioned rats and porcine cholinergic transplants to the hippocampus. *Cell Transplant* **8**, 131-142.
- Leung LS, Shen B, Rajakumar N y Ma J. (2003). Cholinergic activity enhances hippocampal long-term potentiation in CA1 during walking in rats. *J Neurosci* **23**, 9297-9304.
- Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG y Heilman CJ. (1995). Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* **15**, 4077-4092.

- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL y Brann MR. (1991). Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* **11**, 3218-3226.
- Levey AI, Wainer BH, Rye DB, Mufson EJ y Mesulam MM. (1984). Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons intrinsic to rodent cortex and distinction from acetylcholinesterase-positive neurons. *Neuroscience* **13**, 341-353.
- Levin ED, McClernon FJ y Rezvani AH. (2006). Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl)* **184**, 523-539.
- Lewis DA, Hashimoto T y Volk DW. (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **6**, 312-324.
- Lindstrom J, Merlie J y Yogeewaran G. (1979). Biochemical properties of acetylcholine receptor subunits from Torpedo californica. *Biochemistry* **18**, 4465-4470.
- Liu J, Evans MS y Lee TJ. (2002). Presynaptic muscarinic M(2)-receptor-mediated inhibition of N-type Ca(2+) channels in cultured sphenopalatine ganglion: direct evidence for acetylcholine inhibition of cerebral nitroergic neurogenic vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 397-405.
- Liu W, Kumar A y Alreja M. (1998). Excitatory effects of muscarine on septohippocampal neurons: involvement of M3 receptors. *Brain Res* **805**, 220-233.
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH y Lohman AH. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* **70**, 453-511.
- Lorente de N6 R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the Ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**, 113-177.
- Luo L, Chen WH, Wang M, Zhu DM, She JQ y Ruan DY. (2008). Modulation of long-term potentiation by individual subtypes of muscarinic acetylcholine receptor in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* **18**, 989-995.
- Llinas R, Ribary U, Contreras D y Pedroarena C. (1998). The neuronal basis for consciousness. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**, 1841-1849.
- Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, Kronberg E y Mitra PP. (1999). Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15222-15227.
- Ma XH, Zhong P, Gu Z, Feng J y Yan Z. (2003). Muscarinic potentiation of GABA(A) receptor currents is gated by insulin signaling in the prefrontal cortex. *J Neurosci* **23**, 1159-1168.
- Maccaferri G y Lacaille JC. (2003). Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications--making things as simple as possible, not simpler. *Trends Neurosci* **26**, 564-571.
- MacVicar BA y Tse FW. (1989). Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J Physiol* **417**, 197-212.
- Madison DV, Lancaster B y Nicoll RA. (1987). Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *J Neurosci* **7**, 733-741.
- Maehle AH, Prull CR y Halliwell RF. (2002). The emergence of the drug receptor theory. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 637-641.
- Mann EO y Greenfield SA. (2003). Novel modulatory mechanisms revealed by the sustained application of nicotine in the guinea-pig hippocampus in vitro. *J Physiol* **551**, 539-550.

- Mann EO, Suckling JM, Hajos N, Greenfield SA y Paulsen O. (2005). Perisomatic feedback inhibition underlies cholinergically induced fast network oscillations in the rat hippocampus in vitro. *Neuron* **45**, 105-117.
- Manns JR, Stark CE y Squire LR. (2000). The visual paired-comparison task as a measure of declarative memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12375-12379.
- Manuel NA y Davies CH. (1998). Pharmacological modulation of GABA(A) receptor-mediated postsynaptic potentials in the CA1 region of the rat hippocampus. *Br J Pharmacol* **125**, 1529-1542.
- Marchi M y Raiteri M. (1989). Interaction acetylcholine-glutamate in rat hippocampus: involvement of two subtypes of M-2 muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **248**, 1255-1260.
- Marino MJ, Rouse ST, Levey AI, Potter LT y Conn PJ. (1998). Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11465-11470.
- Markowska AL, Olton DS y Givens B. (1995). Cholinergic manipulations in the medial septal area: age-related effects on working memory and hippocampal electrophysiology. *J Neurosci* **15**, 2063-2073.
- Markram H y Segal M. (1990). Long-lasting facilitation of excitatory postsynaptic potentials in the rat hippocampus by acetylcholine. *J Physiol* **427**, 381-393.
- Marks B y McMahon HT. (1998). Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol* **8**, 740-749.
- Marrosu F, Portas C, Mascia MS, Casu MA, Fa M, Giagheddu M, Imperato A y Gessa GL. (1995). Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* **671**, 329-332.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T y Mikoshiba K. (1997). 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* **122**, 498-505.
- Mathie A, Bernheim L y Hille B. (1992). Inhibition of N- and L-type calcium channels by muscarinic receptor activation in rat sympathetic neurons. *Neuron* **8**, 907-914.
- McGehee DS. (2002). Nicotinic receptors and hippocampal synaptic plasticity ... it's all in the timing. *Trends Neurosci* **25**, 171-172.
- McKinney M. (1993). Muscarinic receptor subtype-specific coupling to second messengers in neuronal systems. *Prog Brain Res* **98**, 333-340.
- McQuiston AR y Madison DV. (1999a). Muscarinic receptor activity has multiple effects on the resting membrane potentials of CA1 hippocampal interneurons. *J Neurosci* **19**, 5693-5702.
- McQuiston AR y Madison DV. (1999b). Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* **19**, 2887-2896.
- Mesulam M. (2004a). The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem* **11**, 43-49.
- Mesulam MM. (2004b). The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog Brain Res* **145**, 67-78.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y y Unwin N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955.
- Monmaur P, Collet A, Puma C, Frankel-Kohn L y Sharif A. (1997). Relations between acetylcholine release and electrophysiological characteristics of theta rhythm: a microdialysis study in the urethane-anesthetized rat hippocampus. *Brain Res Bull* **42**, 141-146.

- Morley BJ y Happe HK. (2000). Cholinergic receptors: dual roles in transduction and plasticity. *Hear Res* **147**, 104-112.
- Morton RA, Manuel NA, Bulters DO, Cobb SR y Davies CH. (2001). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor-mediated synaptic responses by GABA(B) receptors in the rat hippocampus. *J Physiol* **535**, 757-766.
- Mulugeta E, Karlsson E, Islam A, Kalaria R, Mangat H, Winblad B y Adem A. (2003). Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Res* **960**, 259-262.
- Mulle C, Steriade M y Deschenes M. (1985). The effects of QX314 on thalamic neurons. *Brain Res* **333**, 350-354.
- Muller W y Connor JA. (1991). Cholinergic input uncouples Ca²⁺ changes from K⁺ conductance activation and amplifies intradendritic Ca²⁺ changes in hippocampal neurons. *Neuron* **6**, 901-905.
- Murayama T y Ui M. (1983). Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J Biol Chem* **258**, 3319-3326.
- Nair HK, Seravalli J, Arbuckle T y Quinn DM. (1994). Molecular recognition in acetylcholinesterase catalysis: free-energy correlations for substrate turnover and inhibition by trifluoro ketone transition-state analogs. *Biochemistry* **33**, 8566-8576.
- Nashmi R, Xiao C, Deshpande P, McKinney S, Grady SR, Whiteaker P, Huang Q, McClure-Begley T, Lindstrom JM, Labarca C, Collins AC, Marks MJ y Lester HA. (2007). Chronic nicotine cell specifically upregulates functional alpha 4* nicotinic receptors: basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path. *J Neurosci* **27**, 8202-8218.
- Nathanson NM. (1987). Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu Rev Neurosci* **10**, 195-236.
- Newman EL, Gupta K, Climer JR, Monaghan CK y Hasselmo ME. (2012). Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Front Behav Neurosci* **6**, 24.
- Niewenhuys R, Voogd J y van Huijzen C. (1982). SNC, sinopsis y atlas del sistema nervioso central humano. Editorial AC. Madrid.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Miyata T y Numa S. (1982). Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* **299**, 793-797.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Furutani Y, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Miyata T y Numa S. (1983). Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature* **302**, 528-532.
- O'Keefe J y Burgess N. (1999). Theta activity, virtual navigation and the human hippocampus. *Trends Cogn Sci* **3**, 403-406.
- O'Keefe J y Recce ML. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* **3**, 317-330.
- Olbrich HG y Braak H. (1985). Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *Anat Embryol (Berl)* **173**, 105-110.
- Olton D, Givens B, Markowska A, Shapiro LA y Golski S. (1991a). Mnemonic functions of the cholinergic septohippocampal system. In *Memory: Organization and Locus of Change*, ed. L. R. Squire, N. M. Weinberger, G. Lynch y J. L. McGaugh, pp. 250-269. Oxford University Press, New York.

- Olton D, Markowska A, Voytko ML, Givens B, Gorman L y Wenk G. (1991b). Basal forebrain cholinergic system: a functional analysis. *Adv Exp Med Biol* **295**, 353-372.
- Olton DS, Markowska A, Breckler SJ, Wenk GL, Pang KC y Koliatsos V. (1991c). Individual differences in aging: behavioral and neural analyses. *Biomed Environ Sci* **4**, 166-172.
- Ostfeld AM y Aruguete A. (1962). Central nervous system effects of hyoscine in man. *J Pharmacol Exp Ther* **137**, 133-139.
- Ovsepian SV, Anwyl R y Rowan MJ. (2004). Endogenous acetylcholine lowers the threshold for long-term potentiation induction in the CA1 area through muscarinic receptor activation: in vivo study. *Eur J Neurosci* **20**, 1267-1275.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB y Kriegstein AR. (1996). Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* **16**, 6414-6423.
- Pang K, Williams MJ y Olton DS. (1993). Activation of the medial septal area attenuates LTP of the lateral perforant path and enhances heterosynaptic LTD of the medial perforant path in aged rats. *Brain Res* **632**, 150-160.
- Pavia J, de Ceballos ML y Sanchez de la Cuesta F. (1998). Alzheimer's disease: relationship between muscarinic cholinergic receptors, beta-amyloid and tau proteins. *Fundam Clin Pharmacol* **12**, 473-481.
- Payne JA. (1997). Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation. *Am J Physiol* **273**, C1516-1525.
- Piccolino M. (1998). Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of Luigi Galvani. *Brain Res Bull* **46**, 381-407.
- Pinault D y Deschenes M. (1992). Voltage-dependent 40-Hz oscillations in rat reticular thalamic neurons in vivo. *Neuroscience* **51**, 245-258.
- Pitler TA y Alger BE. (1990). Activation of the pharmacologically defined M3 muscarinic receptor depolarizes hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* **534**, 257-262.
- Pitler TA y Alger BE. (1992). Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol* **450**, 127-142.
- Pohorecki R, Head R y Domino EF. (1988). Effects of selected muscarinic cholinergic antagonists on [3H]acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* **244**, 213-217.
- Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH y Thompson SM. (2000). Differential control of GABA release at synapses from distinct interneurons in rat hippocampus. *J Physiol* **528 Pt 1**, 123-130.
- Popot JL y Changeux JP. (1984). Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric integral membrane protein. *Physiol Rev* **64**, 1162-1239.
- Power JM y Sah P. (2002). Nuclear calcium signaling evoked by cholinergic stimulation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **22**, 3454-3462.
- Quik M, Philie J y Choremis J. (1997). Modulation of alpha7 nicotinic receptor-mediated calcium influx by nicotinic agonists. *Mol Pharmacol* **51**, 499-506.
- Rae J, Cooper K, Gates P y Watsky M. (1991). Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* **37**, 15-26.
- Raiteri M, Leardi R y Marchi M. (1984). Heterogeneity of presynaptic muscarinic receptors regulating neurotransmitter release in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **228**, 209-214.

- Raiteri M, Marchi M, Paudice P y Pittaluga A. (1990). Muscarinic receptors mediating inhibition of gamma-aminobutyric acid release in rat corpus striatum and their pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **254**, 496-501.
- Ramón y Cajal S. (1911). Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebrales. Vols. 1 y 2. Mantoine, Paris.
- Rasmusson DD. (2000). The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. *Behav Brain Res* **115**, 205-218.
- Reznikov KY. (1991). Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. En: Advances in Anatomy Embriology and Cell Biology. 122. Spriger-Verlag.
- Rezvani AH y Levin ED. (2001). Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry* **49**, 258-267.
- Rhee SG. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**, 281-312.
- Ribak CE y Shapiro LA. (2007). Ultrastructure and synaptic connectivity of cell types in the adult rat dentate gyrus. *Prog Brain Res* **163**, 155-166.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M y Kaila K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-255.
- Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R y Friedhoff LT. (1998). A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* **50**, 136-145.
- Roldan G, Bolanos-Badillo E, Gonzalez-Sanchez H, Quirarte GL y Prado-Alcala RA. (1997). Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. *Neurosci Lett* **230**, 93-96.
- Rouse ST, Hamilton SE, Potter LT, Nathanson NM y Conn PJ. (2000). Muscarinic-induced modulation of potassium conductances is unchanged in mouse hippocampal pyramidal cells that lack functional M1 receptors. *Neurosci Lett* **278**, 61-64.
- Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ y Levey AI. (1999). Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sci* **64**, 501-509.
- Russell JM. (2000). Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* **80**, 211-276.
- Sahara Y y Westbrook GL. (1993). Modulation of calcium currents by a metabotropic glutamate receptor involves fast and slow kinetic components in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **13**, 3041-3050.
- Salgado H, Bellay T, Nichols JA, Bose M, Martinolich L, Perrotti L y Atzori M. (2007). Muscarinic M2 and M1 receptors reduce GABA release by Ca²⁺ channel modulation through activation of PI3K/Ca²⁺ -independent and PLC/Ca²⁺ -dependent PKC. *J Neurophysiol* **98**, 952-965.
- Santafe MM, Lanuza MA, Garcia N y Tomas J. (2006). Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci* **23**, 2048-2056.
- Sarter M y Bruno JP. (2000). Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience* **95**, 933-952.

- Sarter M y Bruno JP. (2002). Mild cognitive impairment and the cholinergic hypothesis: a very different take on recent data. *Ann Neurol* **52**, 384-385.
- Sarter M y Parikh V. (2005). Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci* **6**, 48-56.
- Scanziani M, Gahwiler BH y Thompson SM. (1995). Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by muscarinic and metabotropic glutamate receptor activation in the hippocampus: are Ca²⁺ channels involved? *Neuropharmacology* **34**, 1549-1557.
- Schneggenburger R, Meyer AC y Neher E. (1999). Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* **23**, 399-409.
- Schulman H y Roberts JL. (2008). Intracellular signaling. En Squire y cols. eds. *Fundamental Neuroscience*. California. p205-226.
- Seeger T y Alzheimer C. (2001). Muscarinic activation of inwardly rectifying K(+) conductance reduces EPSPs in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Physiol* **535**, 383-396.
- Segal M y Barker JL. (1984). Rat hippocampal neurons in culture: voltage-clamp analysis of inhibitory synaptic connections. *J Neurophysiol* **52**, 469-487.
- Semba K. (2000). Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance. *Behav Brain Res* **115**, 117-141.
- Shepherd GM. (1979). *The synaptic organization of the brain* (Second edition). Oxford University Press.
- Sherman SM. (2001). Thalamic relay functions. *Prog Brain Res* **134**, 51-69.
- Shimono K, Brucher F, Granger R, Lynch G y Taketani M. (2000). Origins and distribution of cholinergically induced beta rhythms in hippocampal slices. *J Neurosci* **20**, 8462-8473.
- Siegelbaum SA. (1999). CREB can get you depressed. *Neuron* **23**, 414-415.
- Silman I y Sussman JL. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **5**, 293-302.
- Silva AJ. (2003). Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *J Neurobiol* **54**, 224-237.
- Singer W y Gray CM. (1995). Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annu Rev Neurosci* **18**, 555-586.
- Smith CM. (2003). G-protein coupled. En: *Elements of molecular neurobiology*. John Willey & Sons Ltd, eds. p167-196.
- Stanfield BB, Caviness VS, Jr. y Cowan WM. (1979). The organization of certain afferents to the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol* **185**, 461-483.
- Stanfield BB y Cowan WM. (1979). The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol* **185**, 393-422.
- Stewart AE, Yan Z, Surmeier DJ y Foehring RC. (1999). Muscarine modulates Ca²⁺ channel currents in rat sensorimotor pyramidal cells via two distinct pathways. *J Neurophysiol* **81**, 72-84.
- Stewart M y Fox SE. (1990). Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci* **13**, 163-168.
- Sutherland RJ, Wishaw IQ y Regehr JC. (1982). Cholinergic receptor blockade impairs spatial localization by use of distal cues in the rat. *J Comp Physiol Psychol* **96**, 563-573.

- Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, Andra M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K y Nakata Y. (2006). Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res* **83**, 1461-1470.
- Swanwick CC, Murthy NR, Mtchedlishvili Z, Sieghart W y Kapur J. (2006). Development of gamma-aminobutyric acidergic synapses in cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol* **495**, 497-510.
- Szymusiak R, Alam N y McGinty D. (2000). Discharge patterns of neurons in cholinergic regions of the basal forebrain during waking and sleep. *Behav Brain Res* **115**, 171-182.
- Tai K, Bond SD, MacMillan HR, Baker NA, Holst MJ y McCammon JA. (2003). Finite element simulations of acetylcholine diffusion in neuromuscular junctions. *Biophys J* **84**, 2234-2241.
- Taylor SS, Buechler JA y Yonemoto W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **59**, 971-1005.
- Thompson AK, Mostafapour SP, Denlinger LC, Bleasdale JE y Fisher SK. (1991). The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for Gp in receptor compartmentation. *J Biol Chem* **266**, 23856-23862.
- Tiesinga P y Sejnowski TJ. (2009). Cortical enlightenment: are attentional gamma oscillations driven by ING or PING? *Neuron* **63**, 727-732.
- Toselli M, Lang J, Costa T y Lux HD. (1989). Direct modulation of voltage-dependent calcium channels by muscarinic activation of a pertussis toxin-sensitive G-protein in hippocampal neurons. *Pflugers Arch* **415**, 255-261.
- Toselli M y Lux HD. (1989). GTP-binding proteins mediate acetylcholine inhibition of voltage dependent calcium channels in hippocampal neurons. *Pflugers Arch* **413**, 319-321.
- Toth K, Freund TF y Miles R. (1997). Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J Physiol* **500** (Pt 2), 463-474.
- Traub RD, Bibbig A, LeBeau FE, Buhl EH y Whittington MA. (2004). Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro. *Annu Rev Neurosci* **27**, 247-278.
- Traub RD, Draguhn A, Whittington MA, Baldeweg T, Bibbig A, Buhl EH y Schmitz D. (2002). Axonal gap junctions between principal neurons: a novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. *Rev Neurosci* **13**, 1-30.
- Traub RD, Miles R y Wong RK. (1989). Model of the origin of rhythmic population oscillations in the hippocampal slice. *Science* **243**, 1319-1325.
- Traub RD, Whittington MA, Colling SB, Buzsaki G y Jefferys JG. (1996). Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo. *J Physiol* **493** (Pt 2), 471-484.
- Tully T, Bourtchouladze R, Scott R y Tallman J. (2003). Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 267-277.
- Uhlhaas PJ y Singer W. (2006). Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron* **52**, 155-168.
- Van der Zee EA y Luiten PG. (1993). GABAergic neurons of the rat dorsal hippocampus express muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res Bull* **32**, 601-609.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ y Waterfield MD. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**, 535-602.

- Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E y Martinerie J. (2001). The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat Rev Neurosci* **2**, 229-239.
- Vernadakis A, Nidess R, Timiras ML y Schlesinger R. (1976). Responsiveness of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in neural cells to age and cell density in culture. *Exp Cell Res* **97**, 453-457.
- Vertes RP, Hoover WB y Viana Di Prisco G. (2004). Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance. *Behav Cogn Neurosci Rev* **3**, 173-200.
- Vertes RP y Kocsis B. (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* **81**, 893-926.
- Vilaro MT, Palacios JM y Mengod G. (1994). Multiplicity of muscarinic autoreceptor subtypes? Comparison of the distribution of cholinergic cells and cells containing mRNA for five subtypes of muscarinic receptors in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **21**, 30-46.
- Vizi ES y Lendvai B. (1999). Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* **30**, 219-235.
- Volpicelli LA y Levey AI. (2004). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res* **145**, 59-66.
- Wang XJ. (2010). Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition. *Physiol Rev* **90**, 1195-1268.
- Wang XJ y Buzsaki G. (1996). Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J Neurosci* **16**, 6402-6413.
- Waugh MG, Challiss RA, Berstein G, Nahorski SR y Tobin AB. (1999). Agonist-induced desensitization and phosphorylation of m1-muscarinic receptors. *Biochem J* **338** (Pt 1), 175-183.
- Wess J. (2004). Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 423-450.
- Wess J, Eglen RM y Gautam D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 721-733.
- Wettschureck N y Offermanns S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85**, 1159-1204.
- Whitehouse PJ. (1993). Cholinergic therapy in dementia. *Acta Neurol Scand Suppl* **149**, 42-45.
- Whittington MA, Traub RD y Jefferys JG. (1995). Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* **373**, 612-615.
- Whittington MA, Traub RD, Kopell N, Ermentrout B y Buhl EH. (2000). Inhibition-based rhythms: experimental and mathematical observations on network dynamics. *Int J Psychophysiol* **38**, 315-336.
- Wickman K y Clapham DE. (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* **75**, 865-885.
- Widmer H, Ferrigan L, Davies CH y Cobb SR. (2006). Evoked slow muscarinic acetylcholinergic synaptic potentials in rat hippocampal interneurons. *Hippocampus* **16**, 617-628.
- Wilkinson D y Murray J. (2001). Galantamine: a randomized, double-blind, dose comparison in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* **16**, 852-857.

- Williams S y Johnston D. (1990). Muscarinic depression of synaptic transmission at the hippocampal mossy fiber synapse. *J Neurophysiol* **64**, 1089-1097.
- Winson J. (1978). Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* **201**, 160-163.
- Wonnacott S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* **20**, 92-98.
- Wu M, Newton SS, Atkins JB, Xu C, Duman RS y Alreja M. (2003). Acetylcholinesterase inhibitors activate septohippocampal GABAergic neurons via muscarinic but not nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 535-543.
- Yamasaki M, Matsui M y Watanabe M. (2010). Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. *J Neurosci* **30**, 4408-4418.
- Yamashita N, Hayashi A, Baba J y Sawa A. (1997). Rolipram, a phosphodiesterase-4-selective inhibitor, promotes the survival of cultured rat dopaminergic neurons. *Jpn J Pharmacol* **75**, 155-159.
- Young KW, Billups D, Nelson CP, Johnston N, Willets JM, Schell MJ, Challiss RA y Nahorski SR. (2005). Muscarinic acetylcholine receptor activation enhances hippocampal neuron excitability and potentiates synaptically evoked Ca(2+) signals via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate depletion. *Mol Cell Neurosci* **30**, 48-57.
- Zhang H, Lin SC y Nicolelis MA. (2010). Spatiotemporal coupling between hippocampal acetylcholine release and theta oscillations in vivo. *J Neurosci* **30**, 13431-13440.
- Zhang HM, Chen SR, Matsui M, Gautam D, Wess J y Pan HL. (2006). Opposing functions of spinal M2, M3, and M4 receptor subtypes in regulation of GABAergic inputs to dorsal horn neurons revealed by muscarinic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* **69**, 1048-1055.
- Zhang HM, Li DP, Chen SR y Pan HL. (2005). M2, M3, and M4 receptor subtypes contribute to muscarinic potentiation of GABAergic inputs to spinal dorsal horn neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 697-704.
- Zhang L, Spigelman I y Carlen PL. (1991). Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurones of immature rat hippocampal slices. *J Physiol* **444**, 25-49.
- Zhang SJ y Jackson MB. (1993). GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings. *Science* **259**, 531-534.
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI y Wess J. (2002). Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* **22**, 1709-1717.
- Zhong P, Gu Z, Wang X, Jiang H, Feng J y Yan Z. (2003). Impaired modulation of GABAergic transmission by muscarinic receptors in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **278**, 26888-26896.
- Zhong Y y Wu CF. (1991). Altered synaptic plasticity in *Drosophila* memory mutants with a defective cyclic AMP cascade. *Science* **251**, 198-201.
- Zucker RS y Regehr WG. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**, 355-405.